

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :

C12N 15/12, C12Q 1/68, C07K 14/705

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/37761

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum:

29. Juli 1999 (29.07.99)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE98/03818

(22) Internationales Anmeldedatum: 30. Dezember 1998
(30.12.98)

(30) Prioritätsdaten:
197 58 401.2 30. Dezember 1997 (30.12.97) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):
MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE
MEDIZIN [DE/DE]; Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125
Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HOEHE, Margret [DE/DE];
Bartningallee 7, D-10557 Berlin (DE). TIMMERMANN,
Bernd [DE/DE]; Schreinerstrasse 59, D-10247 Berlin
(DE). KÖPKE, Karla [DE/DE]; Franz-Schmidt-Strasse 19,
D-13125 Berlin (DE).

(74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; BioTez Berlin-Buch GmbH,
Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin
(DE).

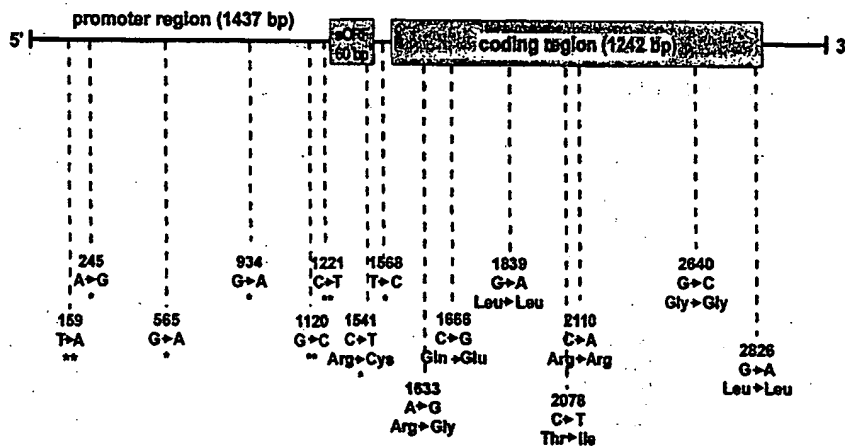
(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BY, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,
IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV,
MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD,
SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN,
YU, ZW, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI
Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen
eintreffen.

(54) Title: NOVEL SEQUENCE VARIANTS OF THE HUMAN BETA2-ADRENERGIC RECEPTOR GENE AND USE THEREOF

(54) Bezeichnung: NEUE SEQUENZVARIANTEN DES MENSCHLICHEN BETA2-ADRENERGEN REZEPTORGENS UND IHRE
VERWENDUNG


(57) Abstract

The invention relates to novel sequence variants of the human beta2-adrenergic receptor gene and to their use for diagnosing a range of diseases, especially for detecting a predisposition to high blood pressure, for diagnosing reactivity to therapeutic agents where this varies from one case to the next, and for developing therapeutic agents on the basis of pharmacogenetic principles.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft neue Sequenzvarianten des menschlichen beta2-adrenergen Rezeptorgens und ihre Verwendung zur Diagnose eines Spektrums von Erkrankungen, insbesondere zur Feststellung von Bluthochdruck-Dispositionen, zur Diagnose einer individuell unterschiedlichen Ansprechbarkeit auf Therapeutika und zur Therapeutika-Entwicklung auf der Basis pharmakogenetischer Prinzipien.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | | | |
|----|------------------------------|----|-----------------------------------|----|---|----|--------------------------------|
| AL | Albanien | ES | Spanien | LS | Lesotho | SI | Slowenien |
| AM | Armenien | FI | Finnland | LT | Litauen | SK | Slowakei |
| AT | Österreich | FR | Frankreich | LU | Luxemburg | SN | Senegal |
| AU | Australien | GA | Gabun | LV | Lettland | SZ | Swasiland |
| AZ | Aserbaidschan | GB | Vereinigtes Königreich | MC | Monaco | TD | Tschad |
| BA | Bosnien-Herzegowina | GE | Georgien | MD | Republik Moldau | TG | Togo |
| BB | Barbados | GH | Ghana | MG | Madagaskar | TJ | Tadschikistan |
| BE | Belgien | GN | Guinea | MK | Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Griechenland | ML | Mali | TR | Türkei |
| BG | Bulgarien | HU | Ungarn | MN | Mongolei | TT | Trinidad und Tobago |
| BJ | Benin | IE | Irland | MR | Mauretanien | UA | Ukraine |
| BR | Brasilien | IL | Israel | MW | Malawi | UG | Uganda |
| BY | Belarus | IS | Island | MX | Mexiko | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| CA | Kanada | IT | Italien | NE | Niger | UZ | Usbekistan |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan | NL | Niederlande | VN | Vietnam |
| CG | Kongo | KE | Kenia | NO | Norwegen | YU | Jugoslawien |
| CH | Schweiz | KG | Kirgisistan | NZ | Neuseeland | ZW | Zimbabwe |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | PL | Polen | | |
| CM | Kamerun | KR | Republik Korea | PT | Portugal | | |
| CN | China | KZ | Kasachstan | RO | Rumänien | | |
| CU | Kuba | LC | St. Lucia | RU | Russische Föderation | | |
| CZ | Tschechische Republik | LI | Liechtenstein | SD | Sudan | | |
| DE | Deutschland | LK | Sri Lanka | SE | Schweden | | |
| DK | Dänemark | LR | Liberia | SG | Singapur | | |
| EE | Estland | | | | | | |

Neue Sequenzvarianten des menschlichen beta2-adrenergen Rezeptorgens und ihre Verwendung

Die Erfindung betrifft neue Sequenzvarianten des menschlichen beta2-adrenergen Rezeptorgens und ihre Verwendung zur Diagnose eines Spektrums von Erkrankungen, insbesondere zur Feststellung von Bluthochdruck-Dispositionen und zur Therapeutika-Entwicklung auf der Basis pharmakogenetischer Prinzipien.

Der menschliche beta2-adrenerge Rezeptor ist eine wichtige Komponente des sympathischen Nervensystems und reguliert als solche ein Spektrum zentraler und peripherer Funktionen, wie z.B. Herz-Kreislauf-Funktionen, metabolische Funktionen, zentralnervöse Funktionen und Neurosekretion. Er ist Angriffspunkt von Pharmaka/Therapeutika mit einem breiten Indikationsspektrum, die mit zu den am häufigsten verordneten Medikamenten gehören. Vielfältige Befunde weisen daraufhin, daß dieser Rezeptor eine Rolle in der Pathogenese/Pathophysiologie einer Reihe häufiger Erkrankungen spielen könnte, wie z.B. der Hypertonie und anderen Herz-Kreislauf-Erkrankungen, verschiedenen neuropsychiatrischen Erkrankungen wie z.B. Depression, und metabolischen Erkrankungen wie z.B. Fettsucht (Insel PA (Ed) (1987) Adrenergic receptors in man, Marcel Dekker, New York, Basel).

Die Erfindung hat das Ziel, Varianten, Polymorphismen, Mutationen und resultierende Haplotypen in der DNA-Sequenz des menschlichen beta2-adrenergen Rezeptorgens zu ermitteln und deren Korrelationen mit Krankheitsdispositionen festzustellen. Ausgehend von diesen Korrelationen soll ein Verfahren zur Diagnose dieser Krankheitsdispositionen, zur Prädiktion von Schweregrad, Verlauf und Überlebenszeit, ein System zur Prädiktion der individuellen Ansprechbarkeit auf beta2 aktive Therapeutika, zur Entwicklung individuell spezifischer beta2 Rezeptoragonisten und -antagonisten, und ein System zur Entwicklung einer neuen Klasse von beta2 wirksamen Therapeutika, sowie die Entwicklung von Testsystemen zur Erforschung pathophysiologischer Zusammenhänge und Entwicklung oben genannter Therapeutika, entwickelt werden. Zusammenfassend kann für jeden beta2 Genotyp ein individuell optimales Therapeutikum vorhergesagt oder entwickelt werden. Die Aufgabe wird gemäß den Ansprüchen gelöst, die Unteransprüche sind Vorzugsvarianten.

Es wurde gefunden, daß in der 5'-regulierenden Region der Sequenz des menschlichen beta2-adrenergen Rezeptorgens neben den 3 schon bekannten Mutationen in der kodierenden Region (an den Positionen 1633, 1666 und 2078) weitere Varianten vorhanden sind. Es wurde ferner gefunden, daß diese genetischen Varianten mit der Disposition für verschiedene Krankheiten, z. B. Bluthochdruck, korrelieren.

Gegenstand der Erfindung ist danach die Sequenz des menschlichen beta2-adrenergen Rezeptorgens, die an den Positionen 159, 245, 565, 934, 1120, 1221, 1541, 1568, 1633, 1666, 1839, 2078, 2110, 2640, und 2826 ganz oder teilweise mutiert ist. Es handelt sich insbesondere um eine Sequenz, die ganz oder teilweise die Mutationen T→A (Position 159), A→G (Position 245), G→A (Position 565), G→A (Position 934), G→C (Position 1120), C→T (Position 1221), C→T (Arg→Cys) (Position 1541), T→C (Position 1568), A→G (Arg→Gly) (Position 1633), C→G (Gln→Glu) (Position 1666), G→A (Position 1839), C→T (Thr→Ile) (Position 2078), C→A (Position 2110), G→C (Position 2640), und G→A (Position 2826) enthält (Abbildungen 1, 2a und 2b).

Besonders wichtig sind folgende Sequenzen (Haplotypen):

- Sequenz mit den Mutationen 1541 T, 1633 A und 1666 C,
- Sequenz mit den Mutationen 1541 C, 1633 G und 1666 G,
- Sequenz mit den Mutationen 1541 T, 1633 G und 1666 C,
- Sequenz mit den Mutationen 1541 T, 1568 T, 1633 A und 1666 C,
- Sequenz mit den Mutationen 1541 C, 1568 C, 1633 G und 1666 G sowie die
- Sequenz mit den Mutationen 1541 T, 1568 T, 1633 G und 1666 C.

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Bestimmung von Krankheitsdispositionen, wobei alle Sequenzen und Varianten des beta2-adrenergen Rezeptorgens von der Einzelmutation bis zu allen möglichen Kombinationen aller Varianten (einschließlich jeder beliebigen absoluten Anzahl von Varianten, die mit einbezogen werden können) genotypisiert werden können und die entsprechenden Aussagen über Krankheitsdispositionen ermöglichen.

Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß die DNA eines Probanden isoliert und mindestens an einer der ausgetauschten Positionen genotypisiert und nachfolgend mit der Referenz-DNA-Sequenz verglichen wird. Bevorzugt sind Ausführungsformen, in denen mindestens die Position 1633, mindestens die drei Positionen 1541, 1633 und 1666 bzw. die vier letztgenannten Positionen (1541, 1568, 1633 und 1666) oder an den sieben Positionen 245, 565 934, 11541, 1568, 1633 und 1666 genotypisiert werden.

Das Verfahren kann auch variiert werden, indem mindestens 3 der 4 Positionen 1541, 1568, 1633 und 1666 genotypisiert und nachfolgend mit der Referenz-DNA-Sequenz verglichen wird. Bevorzugt ist hier die Genotypisierung der Positionen 1541, 1633 und 1666.

Die Genotypisierung erfolgt durch Sequenzierung oder durch andere Methoden, die für die Detektion von Punktmutationen geeignet sind. Dazu gehören PCR-gestützte Genotypisierungsverfahren wie z. B. allelspezifische PCR, andere Genotypisierungsverfahren unter Verwendung von Oligonukleotiden (Beispiele wären 'dot blotting', oder 'Oligonucleotide Ligation Assays' (OLA)), Verfahren unter Verwendung von Restriktionsenzymen, und 'Single Nucleotide Polymorphism' (SNP) Analyse mittels 'Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry (MALDI), sowie prinzipiell jedwede zukünftig zur Verfügung stehende Methode zur Variantendetektion einschließlich der Chip-Technologie in all ihren technologischen Ausführungen.

Ausgehend davon ist das erfindungsgemäße Verfahren zur Bestimmung eines breiten Spektrums verschiedenster Krankheitsdispositionen geeignet.

In einer Ausführungsvariante z.B. zur Bestimmung einer Disposition für Bluthochdruck, (bzw. der Vorhersage des Bereichs der individuellen Blutdruckwerte als solche), und anderer kardiovaskulärer Erkrankungen, einschließlich Myokardinfarkt und Schlaganfall, im weitesten Sinne die Entstehung einer terminalen Niereninsuffizienz (mit Dialysebedarf).

Eine weitere bevorzugte Ausführungsvariante gestattet z.B. die Bestimmung einer Disposition für neuropsychiatrischen Erkrankungen wie Depressionen und Angstsyndromen (anxiety disorders), attention deficit disorder (mit Hyperactivity), Eßstörungen, z.B. für Anorexia nervosa und Bulimie, oder durch posttraumatischen Streß ausgelöste Störungen; oder für Krankheiten des autonomen Nervensystem, wie z.B. Bradbury-Eggleston, Sky-Drager und Riley-Day Syndrom sowie selektive noradrenerge und Barorezeptor-Dispositionen, oder Migräne.

Außerdem ist es auch für den Nachweis von Dispositionen für allergische Erkrankungen, insbesondere Asthma und atopische Störungen, geeignet.

Ein weiteres Einsatzgebiet ist die Bestimmung einer Disposition für metabolische Erkrankungen wie Fettsucht (sowie familiäre 'morbid obesity'), einschließlich einer Vorhersage des Gewichtsbereichs als solchen oder einer Disposition für Gewichtsveränderung, schließlich eine Voraussage des Verhältnisses der Körpermaße als solche, wie sie sich z.B. im 'body mass index' (BMI) ausdrücken.

Desweiteren erlaubt das Verfahren auch die Bestimmung des Verlaufs und des Schweregrads von Erkrankungen, sowie die Prädikation der Überlebensdauer nach schweren medizinischen Erkrankungen, z.B. nach Myokardinfarkt, Herzversagen und/oder Schlaganfall.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsvariante gestattet die Bestimmung einer individuell unterschiedlichen Reaktivität des autonomen Nervensystems, im besonderen auf endogenen und exogenen Streß (wie sie z.B. insbesondere durch eine individuell unterschiedliche Disposition zu Blutdruck- und/oder Herzfrequenzveränderungen (-auslenkungen) auf endogenen und exogenen Streß zum Ausdruck kommt), oder durch individuell unterschiedliche Blutdruckveränderungen auf endogen oder exogen induzierte Veränderungen der Salzkonzentration im Blut (individuell unterschiedliche Salzsensitivität oder -resistenz), und im weitesten Sinne auch durch individuell unterschiedliche Salz- und Wasserregulation bzw. -rückresorption in der Niere (damit zusammenhängend Volumenregulation) zum Ausdruck kommt.

Ein weiterer wichtiger Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der beanspruchten Sequenzvarianten a) zur Vorhersage der individuell unterschiedlichen Ansprechbarkeit auf bisher bekannte Therapeutika (beta2 Rezeptorliganden) sowie der individuell unterschiedlichen Ansprechbarkeit auf die endogenen Liganden Adrenalin und Noradrenalin; b) vorzugsweise zur Entwicklung individuell spezifischer beta2-Rezeptoragonisten und -antagonisten; c) insbesondere auch zur Entwicklung einer neuen Klasse von Therapeutika, die auf das beta2 Rezeptorgen gerichtet sind, am 5' regulatorischen Bereich, Promotorbereich, insbesondere z.B. am Leaderpeptid angreifen, und via Regulation der Transkription, der Translation sowie durch Beeinflussung deren Effizienz, vornehmlich durch Regulation der Expression, wirken.

In diesem Zusammenhang ist weiterer Gegenstand der Erfindung die Vorhersage der individuellen Gewöhnung auf Medikamentengabe (Tachyphylaxie), sowie einer unterschiedlichen Disposition für Arzneimittelnebenwirkungen. Insgesamt wird eine Prädiktion individuell optimaler Therapeutika, denen somit unterschiedliche Wirkmechanismen zugrundeliegen, möglich.

Ein weiterer wichtiger Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der beanspruchten Sequenzvarianten zum Aufbau von Genen bzw. Vektoren, insbesondere zur Entwicklung von pharmazeutisch relevanten Substanzen sowie zur Entwicklung eines diagnostischen Kits oder jedweder diagnostischer Verfahren. Solche Kits oder Verfahren können vorteilhaft zur Vorhersage der individuellen Krankheitsdisposition oder der individuellen Ansprechbarkeit auf verschiedene beta2-Therapeutika eingesetzt werden.

Kulturen (Zellen), die die genannten unterschiedlichsten Kombinationen von individuellen $\beta 2$ -Varianten exprimieren, können somit als Testmodelle für die Entwicklung individuell spezifischer Therapeutika ($\beta 2$ -Agonisten und -antagonisten, sowie $\beta 2$ -expressionsregulierende DNA-Therapeutika) dienen. Das entspricht Testmodellen *in vitro*, aber auch *in vivo* Testmodelle sind eingeschlossen (transgene Tiere, die diese individuellen Rezeptorvarianten tragen).

Als individuelle Testmodelle erlauben sie *in vitro* (=ex vivo) eine Vorhersage zum individuellen Funktionszustand des $\beta 2$ -Rezeptors bzw. der von ihm vermittelten Funktionen.

Der Umfang der beanspruchten Erfindung wird im folgenden ausführlich dargestellt. Zur Erarbeitung der Erfindung wurde die gesamte bekannte DNA-Sequenz des menschlichen $\beta 2$ -adrenergen Rezeptorgens einschließlich seiner regulierenden und kodierenden Regionen in Patienten und Kontrollen mittels der 'Multiplex PCR Sequenzierung' untersucht, und zunächst eine Reihe von genetischen Varianten identifiziert. In der 5' regulierenden Region wurden zum bestehenden Zeitpunkt acht neue Varianten entdeckt, deren wichtigste der Austausch eines hochkonservierten Arg- > Cys im 'Leader Peptide' des Gens (Position 1541) zu sein scheint, das die Translation des Rezeptorgens reguliert (Position -47 relativ zum Translationsstartpunkt), d.h. seine Expression.

Zusammenfassung der neu identifizierten Varianten (Nukleotidposition vor dem Austausch ist in Bezug auf die veröffentlichte $\beta 2$ -Rezeptorsequenz, (Kobilka B.K et al, Proc.Natl.Acad.Sci USA; 84(1): 46-50 (1987)[Acc. No. J02960]; die Angabe in Klammern hinter dem Austausch bezieht sich auf den Translationsstart):

159 T \rightarrow A (-1429)

245 A \rightarrow G (-1343)

565 G \rightarrow A (-1023)

934 G \rightarrow A (-654)

1120 G \rightarrow C (-468)

1221 C \rightarrow T (-367)

1541 C \rightarrow T (-47) Arg \rightarrow Cys Austausch im 'Leader Peptide' des $\beta 2$ -Rezeptorgens

1568 T \rightarrow C (-20)

Diese Varianten sind in den Abbildungen 1, 2a und 2b übersichtlich dargestellt.

Korrelationen mit Erkrankungen bzw. klinisch relevanten Phänotypen:

Spezifische Einflüsse der beiden bisher bekannten Mutationen Arg->Gly (an Position +46 relativ zum Translationsstartpunkt, entspricht Position 16 der Aminosäuresequenz) und Gln->Glu (an Position +79 relativ zum Translationsstartpunkt, entspricht Position 27 der Aminosäuresequenz), sowie der neu entdeckten 'Leader Peptide' Mutation Arg->Cys (an Position -47 relativ zum Translationsstartpunkt) auf eine Reihe von klinisch und pathogenetisch relevanten Phänotypen wurden in mehreren Studien nachgewiesen. So wurde eine signifikante Assoziation der Allele an Position 16 der Aminosäuresequenz mit genetischer Prädisposition zur Hypertonie, sowie extremer ausgelenkten Blutdruckwerten festgestellt. Im weiteren haben die beschriebenen drei Mutationen einen signifikanten Effekt auf phänotypische Parameter wie Herzfrequenz, Noradrenalin-Konzentrationen, Blutdruckveränderungen auf experimentell induzierten physischen und mentalen Stress, 'coping styles' und Persönlichkeitsdimensionen, sowie Gewicht und Gewichtsveränderung. Im besonderen wurde auch eine Assoziation der 'Leader Peptide'-Mutation mit Hypertonie gezeigt. Im weiteren konnte eine Beziehung zwischen beta2-Agonist-induzierter Vasodilatation und beta2 Rezeptormutationen, vorzugsweise an Position 16 der Aminosäuresequenz, hergestellt werden, sowie eine Beziehung zwischen beta2-Rezeptorexpression an Fibroblastenkulturen genotypisierter Individuen und beta2 Rezeptormutationen, vorzugsweise an Position 16 der Aminosäuresequenz.

Detektion spezifischer Dreierkombinationen der Mutationen an Positionen (relativ zur veröffentlichten beta2-Sequenz, Kobilka et al. 1987) 1541 C -> T ('Leader Peptide' Mutation Arg->Cys), 1633 A -> G (Arg->Gly), und 1666 C -> G (Gln->Glu):

Kombination 1: 1541 T (Cys Allel), 1633 A (Arg Allel), 1666 C (Gln Allel)

Kombination 2: 1541 C (Arg Allel), 1633 G (Gly Allel), 1666 G (Glu Allel)

Kombination 3: 1541 T (Cys Allel), 1633 G (Gly Allel), 1666 C (Gln Allel)

Diese drei spezifischen Kombinationen kommen in 80 - 95% der Bevölkerung vor, sie scheinen evolutionär aus der Gesamtanzahl zu erwartender Kombinationen selektioniert zu sein und stellen verschiedene funktionale Zustände des menschlichen beta2-adrenergen Rezeptors dar, die der Variabilität physiologischer und pathophysiologischer Funktionen zugrundeliegen. Im besonderen sind sie mit einer individuell unterschiedlichen Ansprechbarkeit auf endogene Liganden wie Adrenalin und Noradrenalin verbunden, sowie mit einer unterschiedlichen therapeutischen Ansprechbarkeit auf beta2 Rezeptoragonisten und -antagonisten, was diese 'Kombinationen' zum Ausgangspunkt zur Entwicklung 'individuell maßgeschneiderter Pharmakotherapie' machen kann.

Detektion spezifischer beta2- 'Haplotypen' bestehend aus vier Varianten: an Positionen (relativ zur veröffentlichten beta2-Sequenz, Kobilka et al. 1987) 1541 C → T ('Leader Peptide' Mutation Arg-→Cys), 1568 T-→C; 1633 A -> G (Arg-→Gly), und 1666 C -> G(Gln-→Glu):

Kombination 1: 1541 T (Cys Allel), 1568 T, 1633 A (Arg Allel), 1666 C (Gln Allel)

Kombination 2: 1541 C (Arg Allel), 1568 C, 1633 G (Gly Allel), 1666 G (Glu Allel)

Kombination 3: 1541 T (Cys Allel), 1568 T, 1633 G (Gly Allel), 1666 C (Gln Allel)

Kombination 1 wurde signifikant häufiger bei Individuen beobachtet, die erblich mit Hypertonie belastet waren, und stellt somit einen genetischen Risikofaktor dar.

Detektion spezifischer beta2- 'Haplotypen' bestehend aus sieben Varianten:

Unter rechnerischer Berücksichtigung aller Varianten konnten 'Haplotypen', die aus sieben Varianten (einschließlich der drei genannten Mutationen) bestehen, extrahiert werden; den Berechnungen lag das Ziel zugrunde, 'Haplotypen' aus der Gesamtheit des Genoms zu identifizieren, die hinreichend waren, die Patientengruppe von der Kontrollgruppe zu unterscheiden. Ein spezifischer 'Haplotyp', Kombination 1, läßt sich bei genetischer Belastung mit Hypertonie häufiger beobachten, und dies läßt sich auf andere Phänotypen erweitern.

Kombination 1: 245 G, 565 G, 934 A, 1541 T (Cys Allel), 1568 T, 1633 A (Arg Allel), 1666 C (Gln Allel)

Kombination 2: 245 A, 565 A, 934 G, 1541 C (Arg Allel), 1568 C, 1633 G (Gly Allel), 1666 G (Glu Allel)

Kombination 3: 245 G, 565 G, 934 G, 1541 T (Cys Allel), 1568 T, 1633 G (Gly Allel), 1666 C (Gln Allel)

Diese zuletzt beschriebenen 'Haplotypen' beschreiben schließlich den realen, gesamten individuellen Funktionszustand des Rezeptors. Der Erfindung liegt das Konzept zugrunde, daß es nicht einzelne Mutationen sind, die unterschiedlichen funktionellen (dysfunktionalen) Rezeptorzuständen zugrundeliegen, sondern diese durch die individuelle 'polymorphe' Gesamtgenesequenz als funktionsdeterminierender Einheit bedingt werden.

Die Erfindung wird anschließend durch ein Ausführungsbeispiel näher erläutert.

Material und Methoden

Für die Erhebung des gesamten polymorphen Spektrums des beta2-Rezeptorgens wurde die Multiplex-PCR-Sequenziermethode verwendet. Hierzu wurde die gesamte bisher bekannte Promoterregion und die kodierende Region in acht Fragmente unterteilt und mittels PCR amplifiziert (siehe Abb. 1). Diese PCR Fragmente wurden gepoolt und simultan sequenziert. Die Fragmente der Terminationsreaktionen wurden auf einem Sequenzgel aufgetrennt und mittels Direkter Transfer Elektrophorese (DTE) auf eine Nylonmembran übertragen. Die Dekodierung der einzelnen Sequenzleitern erfolgte durch sukzessives Hybridisieren mit spezifischen Oligonukleotiden.

Die spezifischen Bedingungen für die Amplifikation waren wie folgt:

Für Fragment I wurde der Vorwärtsprimer ADRBR-F1 mit der Sequenz 5'-TATTGGCCAGGATCTTTTGCTTCTAT-3' und der Rückwärtsprimer ADRBR-R1 mit der Sequenz 5'-TAACATTAAGAACATTTTGAAGC-3' verwendet. Fragment II wurde mit Hilfe der beiden Primer ADRBR-F2: 5'-GCATACCCCGCTCCAGATAAA-3' und ADRBR-R2: 5'-GCACGCACATACAGGCACAAATAC-3' amplifiziert. Für Fragment III waren es die beiden Primer ADRBR-F3: 5'-GGCCGCGTTTCTGTGTTGG-3' und ADRBR-R3: 5'-AGTGCGTTCTGCCCCGTTATGTG-3'. Für das Fragment VIII die beiden Primer ADRBR-F8: 5'-GGTACTGTGCCTAGCGATAAC-3' und ADRBR-R8: 5'-TAAAATACCCCGTGTGAGCAAATAAGAG-3'. Die Reaktionsbedingungen für diese vier Fragmente waren wie folgt: 10 x PCR Puffer (100 mM Tris-HCl, 15 mM MgCl₂ x 6 H₂O, 500 mM KCl, pH 8,3), dNTP 2 mM, 30 µM Primer F, 30 µM Primer R, 50 ng genomische DNA und 5 U einer *Taq* DNA Polymerase. Alle drei Fragmente wurden mit folgendem Temperaturprofil amplifiziert: 94 °C 4 min; 35 Zyklen: 94 °C 30 sec, 60 °C 30 sec, 72 °C 1 min und abschließend 72 °C 10 min.

Fragment IV wurde mit Hilfe der beiden Primer ADRBR-F4: 5'-GGGGAGGGAAAGGGGAGGAG-3' und ADRBR-R4: 5'-CTGCCAGGCCCATGACCAGAT-3' amplifiziert. Für Fragment VII wurden die Primer ADRBR-F7: 5'-CTGGCTGCCCTTCTTCATCGTT-3' und ADRBR-R7: 5'-TACCCTCAAGTTAAATAGTCTGTT-3' verwendet. Die Bedingungen für diese beiden PCR-Reaktionen waren wie folgt: 10 x PCR Puffer (160 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1 % Tween-20, 500 mM KOH, pH), dNTP 2 mM, 30 µM Primer F, 30 µM Primer R, 50 ng genomische DNA und 4 U eines Gemisches aus der *Taq* DNA Polymerase und einer thermostabilen inorganischen Pyrophosphatase von *Thermus thermophilus*. Beide Fragmente wurden mit folgendem Temperaturprofil amplifiziert: 94 °C 4 min; 35 Zyklen: 94 °C 30 sec, 66 °C [Fragment IV] bzw. 60 °C [Fragment VII] 30 sec, 72 °C 1 min und abschlie-

End 72 °C 10 min.

Fragment V wurde mittels der beiden Primer ADRBR-F5: 5'-ATGCGCCGGACCACGAC-3' und ADRBR-R5: 5'-GTAGAAGGACACGATGGA-3' amplifiziert, Fragment VI mit den beiden Primern ADRBR-F6: 5'-GCTACTTTGCCATTACTTCACC-3' und ADRBR-R6: 5'-AAATCTGGGCTCCGGCAGTAGATAAG-3'. Diese beiden Fragmente wurden mit Hilfe des 'AmpliTaQ Gold Kits' von Perkin Elmer amplifiziert. Das Temperaturprofil bei diesen beiden Fragmenten war wie folgt: 94 °C 10 min; 35 Zyklen: 94 °C 30 sec, 56 °C [Fragment V] bzw. 58 °C [Fragment VI] 30 sec, 72 °C 1 min und abschließend 72 °C 10 min.

Die Sequenzierung erfolgte mit Hilfe des 'Thermo Sequenase cycle sequencing kit' von Amersham. Als Sequenzierprimer wurden die oben beschriebenen PCR Primer verwendet. Die Sequenzierung wurde in vier Multiplex-Pools durchgeführt. Pool 1 enthielt die Sequenzierprimer ADRBR-F1, ADRBR-F3, ADRBR-F5 und ADRBR-F7; Pool 2 die Sequenzierprimer ADRBR-R1, ADRBR-R3, ADRBR-R5 und ADRBR-R7. In beide Sequenzier-Pole wurden die PCR-Fragmente I, III, V und VII eingesetzt. Pool 3 hingegen enthielt die Sequenzierprimer ADRBR-F2, F4, F6 und F8; Pool 4 die Sequenzierprimer ADRBR-R2, R4, R6 und R8. In diese beiden Pools wurden die Fragmente II, IV, VI und VIII eingesetzt.

Sämtliche PCR- und Sequenzierungsreaktionen wurden in einem PTC 225 Cycler von MJ Research durchgeführt.

Die Produkte der Sequenzreaktionen wurden auf einem 100 µm dicken Acrylamidgel (5% Acrylamid, 7 M Harnstoff) aufgetrennt und unter Standard DTE Bedingungen (siehe Richterich and Church, 1993), auf eine Biotin A Membran (Pall) übertragen. Die Membran wurde dann mit ³²P- markierten Oligonukleotiden hybridisiert und die einzelnen Sequenzleitern mit Hilfe eines Phospho-Fluorimager (Storm 860, Molecular Dynamics) detektiert.

Literatur:

Kobilka B.K., Dixon R.A., Frielle T., Dohlman H.G., Bolanowski M.A., Sigal I.S., Yang Feng T.L., Francke U., Caron M.G., Lefkowitz R.J.: cDNA for the beta 2-adrenergic receptor: a protein with multiple membrane-spanning domains and encoded by a gene whose chromosomal location is shared with that of the receptor for platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA.*; 84 (1): 46-50 (1987).

Parola A.L. and Kobilka B.K. The peptide product of a 5' leader cistron in the beta 2 adrenergic receptor mRNA inhibits receptor synthesis. *J Biol Chem.* 269 (6): 4497-505 (1994).

Richterich P. and Church G.M.: DNA sequencing with direct transfer electrophoresis and nonradioactive detection. *Methods Enzymol.* 218: 187-222 (1993).

Legenden zu den Abbildungen:Abbildung 1

Polymorphes Spektrum des menschlichen beta 2-adrenergen Rezeptorgens
Varianten sind entsprechend ihrer Nukleotidposition eingezeichnet
(Referenzsequenz Kobilka et al. 1987).

Abbildung 2 a

Sequenz des menschlichen beta 2-adrenergen Rezeptors (Kobilka et al. 1987)
Varianten sind entsprechend ihrer Position eingezeichnet.

Abbildung 2 b

Sequenz des menschlichen beta 2-adrenergen Rezeptors (Kobilka et al. 1997).
Eingezeichnet sind die Varianten (Nukleotid- bzw. Aminosäureaustausch).

Patentansprüche

1. Sequenz des menschlichen beta2-adrenergen Rezeptorgens, dadurch gekennzeichnet, daß die Basen an den Positionen 159, 245, 565, 934, 1120, 1221, 1541, 1568, 1633, 1666, 1839, 2078, 2110, 2640, und 2826 ganz oder teilweise ausgetauscht sind.

2. Sequenz nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie ganz oder teilweise die Basenaustausche T→A (Position 159), A→G (Position 245), G→A (Position 565), G→A (Position 934), G→C (Position 1120), C→T (Position 1221), C→T (Position 1541), T→C (Position 1568), A→G (Position 1633), C→G (Position 1666), G→A (Position 1839), C→T (Position 2078), C→A (Position 2110), G→C (Position 2640), und G→A (Position 2826) enthält.

3. Sequenz nach Anspruch 1 und 2, gekennzeichnet durch die Mutationen 1541 T, 1633 A und 1666 C.

4. Sequenz nach Anspruch 1 und 2, gekennzeichnet durch die Mutationen 1541 C, 1633 G und 1666 G.

5. Sequenz nach Anspruch 1 und 2, gekennzeichnet durch die Mutationen 1541 T, 1633 G und 1666 C.

6. Sequenz nach Anspruch 1 und 2, gekennzeichnet durch die Mutationen 1541 T, 1568 T, 1633 A und 1666 C.

7. Sequenz nach Anspruch 1 und 2, gekennzeichnet durch die Mutationen 1541 C, 1568 C, 1633 G und 1666 G.

8. Sequenz nach Anspruch 1 und 2, gekennzeichnet durch die Mutationen 1541 T, 1568 T, 1633 G und 1666 C.

9. Verfahren zur Bestimmung von Krankheitsdispositionen, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA eines Probanden isoliert und mindestens an einer der ausgetauschten Positionen genotypisiert und nachfolgend mit der Referenz-DNA-Sequenz verglichen wird, wobei ggf. alle möglichen Kombinationen von Varianten von der Einzelmutteration bis zu allen möglichen Kombinationen aller Varianten einschließlich jeder beliebigen absoluten Anzahl von Varianten einbezogen werden.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA eines Probanden isoliert und mindestens an der Position 1633 genotypisiert wird.
11. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA eines Probanden isoliert und mindestens an den 3 Positionen 1541, 1633 und 1666 genotypisiert wird.
12. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA eines Probanden isoliert und mindestens an den 4 Positionen 1541, 1568, 1633 und 1666 genotypisiert wird.
13. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA eines Probanden isoliert und mindestens an den 7 Positionen 245, 565, 934, 1541, 1568, 1633 und 1666 genotypisiert werden.
14. Verfahren nach Anspruch 9 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Positionen 1541, 1568, 1633 und 1666 genotypisiert werden.
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens 3 der 4 Positionen 1541, 1568, 1633 und 1666 genotypisiert werden.
16. Verfahren zur Bestimmung von Krankheitsdispositionen 9, 11 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Positionen 1541, 1633 und 1666 genotypisiert werden.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Genotypisierung durch Sequenzierung oder durch andere Methoden, die für den Nachweis von Varianten geeignet sind, erfolgt.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 17 zur Bestimmung einer Disposition für Bluthochdruck sowie für Blutdruckabweichungen von der Norm und andere cardiovaskuläre Erkrankungen, einschließlich Myokardinfarkt und Schlaganfall; zur Bestimmung einer Disposition für neuropsychiatrische Erkrankungen wie Depressionen, Angstsyndromen, attention deficit disorder mit Hyperactivity, Eßstörungen, z.B. Anorexia nervosa und Bulimie, oder für durch posttraumatischen Streß ausgelöste Störungen; zur Bestimmung einer Disposition für Krankheiten des autonomen Nervensystem, wie z.B. Bradbury-Eggleston, Sky-Drager und Riley-Day Syndrom sowie selektive noradrenerge und Barorezeptor-Dispositionen, oder Migräne; zur Bestimmung einer Disposition für allergische Erkrankungen, insbesondere Asthma und atopische Störungen; zur Bestimmung einer Disposition für metabolische Erkrankungen wie Fettsucht sowie familiäre 'morbid obesity',

einschließlich einer Vorhersage des Gewichtsbereichs als solchen oder einer Disposition für Gewichtsveränderung, schließlich eine Voraussage des Verhältnisses der Körpermaße als solche, wie sie sich z.B. im 'body mass index' (BMI) ausdrücken.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 17 zur Bestimmung einer individuell unterschiedlichen Reaktivität des autonomen Nervensystems, im besonderen auf endogenen und exogenen Streß.

20. Verfahren nach Anspruch 19 zur Bestimmung einer individuell unterschiedlichen Disposition für Blutdruck- und/oder Herzfrequenzveränderungen/-auslenkungen auf endogenen und exogenen Streß, oder einer individuell unterschiedlichen Salzsensitivität/-resistenz.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 17 zur Bestimmung des Verlaufs und des Schweregrads von Erkrankungen, wie z.B. unter Anspruch 18 aufgeführt, z. B. von neuropsychiatrischen Erkrankungen wie Depressionen und Angstsyndromen, von kardiovaskulären Erkrankungen, einschließlich Myokardinfarkt und Schlaganfall, von Krankheiten des autonomen Nervensystems sowie von allergischen Erkrankungen, wie z.B. Asthma.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 17 zur Bestimmung einer Disposition für metabolische Erkrankungen wie Fettsucht.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 17 zur Prädikation der Überlebensdauer nach schweren medizinischen Erkrankungen, z.B. nach Myokardinfarkt, Herzversagen und/oder Schlaganfall.

24. Verwendung der Sequenzvarianten nach Anspruch 1 bis 8 zur Entwicklung von Therapeutika und/oder Lifestyle-drugs.

25. Verwendung nach Anspruch 24 zur Entwicklung einer neuen Klasse von Therapeutika, die auf das beta2-Rezeptorgen gerichtet sind, und am 5'-regulatorischen Bereich, im Promotorbereich, sowie am Leaderpeptid angreifen, via Regulation der Transkription und Translation sowie durch Beeinflussung von deren Effizienz, vornehmlich durch Regulation der Expression, wirken.

26. Verwendung nach Anspruch 24 zur Entwicklung von beta2-Rezeptoragonisten und -antagonisten, insbesondere von individuell spezifischen beta2-Rezeptoragonisten und -antagonisten.

27. Verwendung nach einem der Ansprüche 9 bis 17 zur Prädiktion der individuell unterschiedlichen Ansprechbarkeit auf bisher bekannte, wie beta2-Rezeptorliganden, sowie zukünftig, auch unter Anspruch 24 bis 26 entwickelte Therapeutika, und der individuell unterschiedlichen Ansprechbarkeit auf die endogenen Liganden Adrenalin und Noradrenalin.

28. Verwendung nach einem der Ansprüche 9 bis 17 zur Vorhersage der individuellen Gewöhnung auf Medikamentengabe (Tachyphylaxie), sowie einer unterschiedlichen Disposition für Arzneimittelnebenwirkungen.

29. Verwendung nach einem der Ansprüche 9 bis 17 zur Optimierung der individuellen, auf den beta2-Rezeptor und sein Gen gerichteten Therapie bzw. Intervention.

30. Verwendung der Sequenzvarianten nach Anspruch 1 bis 8 zum Aufbau von Genen bzw. Vektoren, insbesondere zur Entwicklung von pharmazeutisch relevanten Substanzen.

31. Verwendung nach Anspruch 24 bis 30 zur Entwicklung eines diagnostischen Kits, oder jedweden Verfahrens zur Genotypisierung.

32. Verwendung nach Anspruch 24 bis 31 zur Entwicklung eines diagnostischen Kits zur Vorhersage der individuellen Ansprechbarkeit auf verschiedene beta2-Rezeptor-agonisten sowie -antagonisten, sowie auf jedwede neu entwickelten beta2 aktiven Therapeutika, im besonderen auch nach Anspruch 25; zur Vorhersage der therapeutischen Wirksamkeit von Pharmaka, deren Wirkmechanismus Veränderungen der beta2-Rezeptorstruktur, -regulation, oder -expression miteinbezieht; zur Vorhersage der individuell unterschiedlichen Ansprechbarkeit auf die endogenen Liganden Adrenalin und Noradrenalin; zur Vorhersage der individuellen Gewöhnung auf Medikamentengabe - Tachyphylaxie -, sowie einer unterschiedlichen Disposition für Arzneimittelnebenwirkungen; zur Optimierung der individuellen, auf den beta2-Rezeptor und sein Gen gerichteten Therapie bzw. Intervention.

33. Verwendung nach Anspruch 1 bis 8 sowie 9 bis 32 zur Entwicklung von in vitro (z.B. Zellkulturen) und in vivo (z.B. transgene Tiere) Testsystemen, die individuelle Formen des beta2-Rezeptorgens exprimieren, wobei die Testsysteme zur Untersuchung der Pathophysiologie von Erkrankungen von generell medizinisch wichtigen Merkmalen mit Beteiligung des beta2-Rezeptorgens dienen, sowie zur Entwicklung und Testung individuell spezifischer Therapeutika und 'lifestyle- drugs' und von beta2-gerichteten Substanzen im allgemeinen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 98/03818

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|---|--|
| X | <p>TURKI J ET AL: "Myocardial signaling defects and impaired cardiac function of a human beta 2 - adrenergic receptor polymorphism expressed in transgenic mice."</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, (1996 SEP 17) 93 (19) 10483-8. JOURNAL CODE: PV3. ISSN: 0027-8424., XP002106241</p> <p>United States</p> <p>see the whole document</p> <p>---</p> | 1,2,33 |
| X | <p>TURKI J. ET AL.: "GENETIC POLYMORPHISMS OF THE BETA2-ADRENERGIC RECEPTOR IN NOCTURNAL AND NONNOCTURNAL ASTHMA"</p> <p>JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 95, 1995, pages 1635-1641, XP002106242</p> <p>see the whole document</p> <p>---</p> | 1,2,9, 10, 17-21, 24,26, 27,29, 31-33 |
| X | <p>LARGE V. ET AL.: "Human beta-2 adrenoceptor gene polymorphisms are highly frequent in obesity and associate with altered adipocyte beta-2 adrenoceptor function"</p> <p>JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 100, no. 12, 1997, pages 3005-3013, XP002106243</p> <p>see the whole document</p> <p>---</p> | 1,2,9, 17,18, 22,24, 26,31 |
| A | <p>PAROLA A L ET AL: "The peptide product of a 5' leader cistron in the beta 2 adrenergic receptor mRNA inhibits receptor synthesis."</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, (1994 FEB 11) 269 (6) 4497-505. JOURNAL CODE: HIV. ISSN: 0021-9258., XP002106244</p> <p>United States</p> <p>cited in the application</p> <p>siehe insbes. Abb. 2</p> <p>---</p> | 1-33 |
| A | <p>KOBILKA B K ET AL: "Functional activity and regulation of human beta 2 - adrenergic receptors expressed in Xenopus oocytes."</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, (1987 NOV 15) 262 (32) 15796-802. JOURNAL CODE: HIV. ISSN: 0021-9258., XP002106245</p> <p>United States</p> <p>cited in the application</p> <p>see the whole document</p> <p>---</p> | 1-33 |

-/--

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/12 C12Q1/68 C07K14/705

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K C12N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X | LIGGETT S.: "Polymorphisms of the beta-2 adrenergic receptor and asthma" AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY AND CRITICAL CARE MEDICINE, vol. 156, no. 4, October 1997, pages S156-S162, XP002106240 siehe insbes. Abb. 1 --- -/-- | 1,2 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 June 1999

Date of mailing of the international search report

30/06/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kania, T

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|---|-----------------------|
| A | HALL I.: "Beta-2 adrenoceptor polymorphisms: are they clinically important ?" THORAX, vol. 51, 1996, pages 351-353, XP002106246 see the whole document --- | 1-33 |
| P,X | TIMMERMANN B ET AL: "Novel DNA sequence differences in the beta2 - adrenergic receptor gene promoter region." HUMAN MUTATION, (1998) 11 (4) 343-4. JOURNAL CODE: BRD. ISSN: 1059-7794., XP002106247 United States see abstract --- | 1-8 |
| P,X | TIMMERMANN B. ET AL: ".beta.-2 Adrenoceptor genetic variation is associated with genetic predisposition to essential hypertension: The Bergen Blood Pressure Study" KIDNEY INTERNATIONAL, (1998) 53/6 (1455-1460). REFS: 32 ISSN: 0085-2538 CODEN: KDYIA5, XP002106248 United States see the whole document --- | 1-33 |
| P,X | MCGRAW D W ET AL: "Polymorphisms of the 5' leader cistron of the human beta2 - adrenergic receptor regulate receptor expression." JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, (1998 DEC 1) 102 (11) 1927-32. JOURNAL CODE: HS7. ISSN: 0021-9738., XP002106249 United States see the whole document --- | 1-33 |
| T | SCOTT M G ET AL: "Identification of novel polymorphisms within the promoter region of the human beta2 adrenergic receptor gene." BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY, (1999 FEB) 126 (4) 841-4. JOURNAL CODE: B00. ISSN: 0007-1188., XP002106250 ENGLAND: United Kingdom see the whole document ----- | 1-33 |

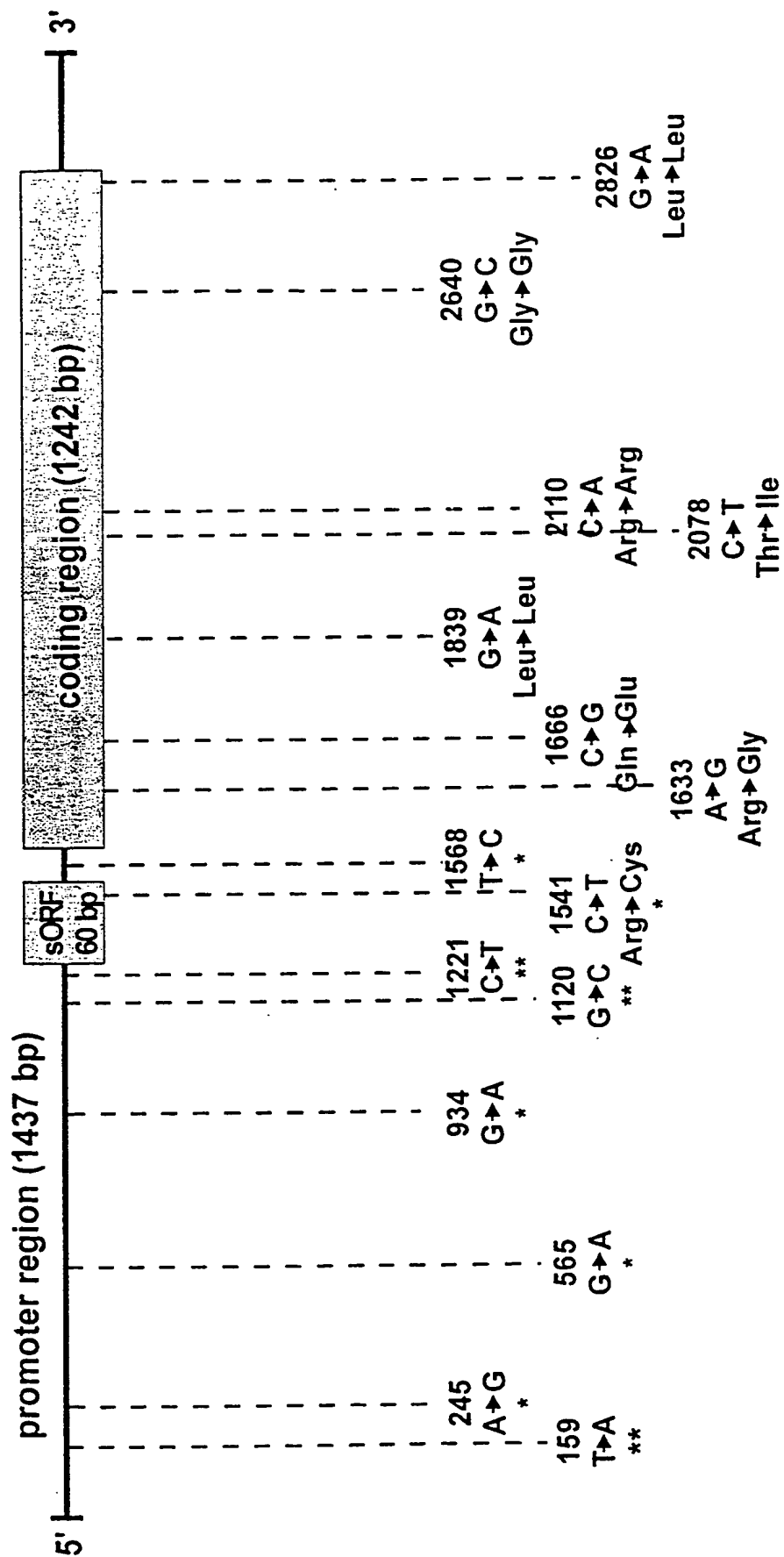


Abb. 1

1 cccgggttca agagattctc ctgtctcagc ctcccgagta gctgggacta caggtagctg
 61 ccaccacacc tggctaattt ttgtattttt agtagagaca agagttacac catattggcc
 121 aggatctttt gctttctata gcttcaaaat gttcttaa^atg ttaagacatt cttataactc
 181 tgaaccatat gaatttgcca ttttggttaag tcacagacgc cagatgggtg caatttcaca
 241 tggc^gacaacc cgaaagatta acaaactatc cagcagatga aaggattttt tttagtttca
 301 ttgggttttac tgaagaaatt gtttgaattc tcattgcac tccagttcaa cagataatga
 361 gtgagtgatg ccacactctc aagagttaaa acaaaaacaa caaaaaaatt aaaacaaaag
 421 cacacaactt tctctctctg tcccaaaata cataacttga taccctcgct ccagataaaa
 481 tccaaagggg aaaactgtct tcatgcctgc aaattcctaa ggagggcacc taaagtactt
 541 gacagcgagt gtgctgagga aatc^aggcagc tgttgaagtc acctcctgtg ctcttgccaa
 601 atgtttgaaa ggggaatacac tgggttaccg ggtgtatgtt gggaggggag cattatcagt
 661 gctcgggtga ggcaagttcg gagtaccag atggagacat ccgtgtctgt gtcgtcttgg
 721 atgcctccaa gccagcgtgt gtttactttc tgtgtgtgtc accatgtctt tgtgttctg
 781 ggtgcttctg tgtttgtttc tggccgcgtt tctgtgttgg acaggggtga ctttgtgccg
 841 gatggcttct gtgtgagagc gcgcgcgagt gtgcatgtcg gtgagctggg aggggtgtgc
 901 tcagtgtcta tggctgtggt tcggtataag tct^agagcatg tctgccaggg tgtatttgtg
 961 cctgtatgtg cgtgcctcgg tgggcactct cgtttccttc cgaatgtggg gcagtgccgg
 1021 tgtgctgccc tctgccttga gacctcaagc gcgcgaggcg cccagggcag gcaggtagcg
 1081 gccacagaag agccaaaagc tcccgggttg gctggtaagg^g acaccacctc cagctttagc
 1141 cctctggggc cagccagggg agccgggaag cagtgggtggc ccgccctcca gggagcagtt
 1201 gggccccgcc cgggccagcc^t caggagaag gagggcgagg ggaggggagg gaaaggggag
 1261 gagtgcctcg ccccttcgcg gctgccggcg tgccattggc cgaaagttcc cgtacgtcac
 1321 ggcgagggca gttcccctaa agtcctgtgc acataacggg cagaacgcac tgcgaagcgg
 1381 cttcttcaga gcacgggctg gaactggcag gcaccgcgag cccctagcac ccgacaagct
 1441 gagtgtgcag gacgagtccc caccacaccc acaccacagc cgctgaatga ggcttccagg
 1501 cgtccgctcg cggcccgag agccccgcg tgggtccg^tcg cgtgaggcg cccccagcca
 1561 gtgcgct^cac ctgccagact gcgcgccatg gggcaaccgg ggaacggcag cgccttcttg
 1621 ctggcaccca at^ggaagcca tgcgccggac cagcagtc^gca cgcag^gaaaag ggacgaggtg
 1681 tgggtgggtg gcatgggcat cgtcatgtct ctcacgtcc tggccatcgt gtttggcaat

1741 gtgctgggtca tcacagccat tgccaagtgc gagcgtctgc agacgggtcac caactacttc
 1801 atcacttcac tggcctgtgc tgatctgggc atgggcct^agg cagtgggtgcc ctttggggcc
 1861 gcccatattc ttatgaaaat gtggactttt ggcaacttct ggtgcgagtt ttggacttcc
 1921 attgatgtgc tgtgctgcac ggccagcatt gagaccctgt gcgtgatcgc agtggatcgc
 1981 tactttgcca ttacttcacc tttcaagtac cagagcctgc tgaccaagaa taaggcccgg
 2041 gtgatcattc tgatgggtgtg gattgtgtca ggcctta^tact cttcttggcc cattcagatg
 2101 cactgggtac^ac gggccaccca ccaggaagcc atcaactgct atgccaatga gacctgctgt
 2161 gacttcttca cgaaccaagc ctatgccatt gcctcttcca tcgtgtcctt ctacgttccc
 2221 ctgggtgatca tggctctcgt ctactccagg gtctttcagg aggccaaaag gcagctccag
 2281 aagattgaca aatctgaggg ccgcttccat gtccagaacc ttagccaggt ggagcaggat
 2341 gggcggacgg ggcattggact ccgcagatct tccaagttct gcttgaagga gcacaaagcc
 2401 ctcaagacgt taggcatcat catgggcact ttcacctct gctggctgcc cttcttcac
 2461 gttaacattg tgcattgtgat ccaggataac ctcatccgta aggaagttaa catcctccta
 2521 aattggatag gctatgtcaa ttctggtttc aatcccccta tctactgccg gagcccagat
 2581 ttcaggattg ccttccagga gcttctgtgc ctgctcaggt cttctttgaa ggcctatgg^cg
 2641 aatggctact ccagcaacgg caacacaggg gagcagagtg gatatcacgt ggaacaggag
 2701 aaagaaaata aactgctgtg tgaagacctc ccaggcacgg aagactttgt gggccatcaa
 2761 ggtactgtgc ctacgataa cattgattca caagggagga attgtagtac aaatgactca
 2821 ctgct^agtaaa gcagtttttc tacttttaaa gaccccccc cccccaacag aacactaaac
 2881 agactattta acttgagggg aataaactta gaataaaatt gtaaaaattg tatagagata
 2941 tgcagaagga agggcatcct tctgcctttt ttattttttt aagctgtaaa aagagagaaa
 3001 acttatttga gtgattattt gttatttgta cagttcagtt cctctttgca tgggaatttgt
 3061 aagtttatgt cttaaagagct ttagtcctag aggacctgag tctgctatat tttcatgact
 3121 tttccatgta tctacctcac tattcaagta ttaggggtaa tatattgctg ctggtaattt
 3181 gtatctgaag gagattttcc ttctacacc cttggacttg aggattttga gtatctcgga
 3241 cctttcagct gtgaacatgg actcttcccc cactcctctt atttctcac acgggggtatt
 3301 ttaggcaggg atttgaggag cagcttcagt tgttttcccc agcaaaggtc taaagtttac
 3361 agtaaaataaa atgtttgacc atgccttcat tgcacctgtt tgtccaaaac cccttgactg
 3421 gagtgtgtt gcctccccca ctggaaacgg c

Abb. 2a

ERSATZBLATT (REGEL 26)

1 cccgggttca agagattctc ctgtctcagc ctcccagta gctgggacta cagggtacgtg
 61 ccaccacacc tggctaattt ttgtattttt agtagagaca agagttacac catattggcc
 121 aggatctttt gctttctata gcttcaaaat gttctta^atg ttaagacatt cttataactc
 181 tgaaccatat gaatttgcca ttttggttaag tcacagacgc cagatgggtg caatttcaca
 241 tggc^gacaacc cgaaagatta acaaactatc cagcagatga aaggattttt tttagtttca
 301 ttgggtttac tgaagaaatt gtttgaattc tcattgcatc tccagttcaa cagataatga
 361 gtgagtgatg ccacactctc aagagttaaa aacaaaacaa caaaaaaatt aaaacaaaag
 421 cacacaactt tctctctctg tcccaaaata cataacttga taccctcgct ccagataaaa
 481 tccaaagggg aaaactgtct tcatgcctgc aaattcctaa ggagggcacc taaagtactt
 541 gacagcgagt gtgctgagga aatc^aggcagc tgttgaagtc acctcctgtg ctcttgccaa
 601 atgtttgaaa gggaatacac tgggttaccg ggtgtatgtt gggaggggag cattatcagt
 661 gctcgggtga ggcaagtctg gagtaccag atggagacat ccgtgtctgt gtcgctctgg
 721 atgcctccaa gccagcgtgt gtttactttc tgtgtgtgtc accatgtctt tgtgcttctg
 781 ggtgcttctg tgtttgtttc tggccgcgtt tctgtgttgg acaggggtga ctttgtgccg
 841 gatggcttct gtgtgagagc gcgcgcgagt gtgcatgtcg gtgagctggg aggggtgtgtc
 901 tcagtgtcta tggctgtggt tcggtataag tct^agagcatg tctgccaggg tgtatttgtg
 961 cctgtatgtg cgtgcctcgg tgggcactct cgtttcttcc cgaatgtggg gcagtgcggg
 1021 tgtgctgccc tctgccttga gacctcaagc gcgcagggcg cccagggcag gcaggtagcg
 1081 gccacagaag agccaaaagc tcccgggttg gctggtaag^c acaccacctc cagcttttagc
 1141 cctctggggc cagccagggt agccgggaag cagtgggtggc ccgcctcca gggagcagtt
 1201 gggccccgcc cgggccagcc ^tcaggagaag gagggcgagg ggaggggagg gaaaggggag
 1261 gagtgcctcg ccccttcgcg gctgccggcg tgccattggc cgaaagtcc cgtacgtcac
 1321 ggcgagggca gttcccctaa agtcctgtgc acataacggg cagaacgcac tgcgaagcgg
 1381 cttcttcaga gcacgggctg gaactggcag gcaccgcgag cccctagcac ccgacaagct
 1441 gagtgtgcag gacgagttcc caccacaccc acaccacagc cgctgaatga ggcttccagg
 1501 cgtccgctcg cggcccgagc agcccgccg tgggtccgcc ^tcgctgaggcg cccccagcca
 1561 gtgcgct^cac ctgccagact gcgcgccatg gggcaaccg ggaacggcag cgccttcttg
 1621 ctggcaccca at^ggaagcca tgcgcgggac cagcagtc cgcag^gaaaag ggacgaggtg
 1681 tgggtgggtg gcatgggcat cgtcatgtct ctcacgtcc tggccatcgt gtttggcaat
 1741 gtgctggtca tcacagccat tgccaagtgc gagcgtctgc agacggtcac caactacttc

1801 atcacttcac tggcctgtgc tgatctgggc atgggcct^ag^(Leu 84 → Leu) cagtgggtgcc ctttggggcc
 1861 gcccatattc ttatgaaaat gtggactttt ggcaacttct ggtgcgagtt ttggacttcc
 1921 attgatgtgc tgtgctgcac ggccagcatt gagaccctgt gcgtgatcgc agtggatcgc
 1981 tactttgcca ttacttcacc tttcaagtac cagagcctgc tgaccaagaa taaggcccgg
 2041 gtgatcattc tgatgggtgtg gattgtgtca ggcccta^tc^(Thr 164 → Ile) cttctttgcc cattcagatg
 2101 cactgggtac^ag^(Arg 175 → Arg) gggccacca ccaggaagcc atcaactgct atgccaatga gacctgctgt
 2161 gactttcttca cgaaccaagc ctatgccatt gcctcttcca tegtgtcctt ctacgttccc
 2221 ctggtgatca tggctctcgt ctactccagg gtctttcagg aggccaaaag gcagctccag
 2281 aagattgaca aatctgaggg ccgcttccat gtccagaacc ttagccaggt ggagcaggat
 2341 gggcggacgg ggcattggact ccgcagatct tccaagttct gcttgaagga gcacaaagcc
 2401 ctcaagacgt taggcatcat catgggcact ttcacctct gctggctgcc cttcttcac
 2461 gttaacattg tgcattgtgat ccaggataac ctcattcgta aggaagttta catcctccta
 2521 aattggatag gctatgtcaa ttctggtttc aatcccccta tctactgccg gagcccagat
 2581 ttcaggattg cttccagga gcttctgtgc ctgcgcaggt cttctttgaa ggcctatgg^c^(Gly351→Gly)
 2641 aatggctact ccagcaacgg caacacaggg gagcagagtg gatatcacgt ggaacaggag
 2701 aaagaaaata aactgctgtg tgaagacctc ccaggcacgg aagactttgt gggccatcaa
 2761 ggtactgtgc ctacgcataa cattgattca caaggagga attgtagtac aaatgactca
 2821 ctgct^ataaa gcagtttttc tacttttaaa gacccccccc ccccaacag aactactaac
 2881 agactattta acttgagggg aataaactta gaataaaatt gtaaaaattg tatagagata
 2941 tgcagaagga agggcatcct tctgcctttt ttattttttt aagctgtaaa aagagagaaa
 3001 acttatttga gtgattatth gttatttgta cagttcagtt cctctttgca tgggaattgt
 3061 aagtttatgt ctaaagagct ttagtcctag aggacctgag tctgctatat ttcatgact
 3121 tttccatgta tctacctcac tattcaagta ttaggggtaa tatattgctg ctggtaattt
 3181 gtatctgaag gagattttcc ttcctacacc cttggacttg aggattttga gtatctcgga
 3241 cctttcagct gtgaacatgg actcttcccc cactcctctt atttgctcac acggggattt
 3301 ttaggcaggg atttgaggag cagcttcagt tgttttcccg agcaaagggtc taaagtttac
 3361 agtaaaataa atgtttgacc atgccttcat tgcacctgtt tgtccaaaac cccttgactg
 3421 gagtgtgtgt gcctccccca ctggaaaccg c

Abb. 26

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

| | | |
|---|---|--|
| Applicant's or agent's file reference PCT/MDC 9803 | FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416) | |
| International application No. PCT/DE98/03818 | International filing date (day/month/year) 30 December 1998 (30.12.98) | Priority date (day/month/year) 30 December 1997 (30.12.97) |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/12 | | |
| Applicant MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN | | |

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet.
- ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).
- These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

| | |
|--|--|
| Date of submission of the demand 26 July 1999 (26.07.99) | Date of completion of this report 30 March 2000 (30.03.2000) |
| Name and mailing address of the IPEA/EP | Authorized officer |
| Facsimile No. | Telephone No. |

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE98/03818

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-10, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. 1-33, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. _____, filed with the letter of _____,
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1-5, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☒ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE98/03818

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 24-33

because:

- ☐ the said international application, or the said claims Nos. _____
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

- ☒ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. 24-33
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported
by the description that no meaningful opinion could be formed.
- ☐ no international search report has been established for said claims Nos. _____.

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

Disclaimers:

Claims 1, 2 and 9 filed with the letter of 13.01.2000 (received 15.01.2000) contain disclaimers intended to establish that these claims are novel over documents D1 and D2. A disclaimer, however, is allowed only when limited to the disclosure in the anticipatory document, with the proviso that the teaching of the said document happens to be anticipatory.

D1 and D2 disclose specific base exchanges in positions 1633, 1666 and 2078 in the sequence of the human beta2-adrenergic receptor gene and methods of determining predispositions to nocturnal asthma and obesity by genotyping in positions 1633 and 1666 (see Box V, paragraphs 1 to 3, novelty). The newly introduced disclaimers do not exclude this teaching, however, but describe the obligatory combination of exchanging and genotyping in positions 1633, 1666 and 2078 with exchanging and genotyping in at least one of the other positions disclosed in the present application. These obligatory combinations represent a novel technical feature which is not disclosed in the original version of the present application.

The claims filed with the letter of 13.01.2000 therefore do not comply with PCT Article 34(2)(b), and hence have not been taken into consideration in this report (PCT Rule 70.2(c)).

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III.

**Non-establishment of opinion with regard to novelty,
inventive step and industrial applicability for Claims 24
to 33.**

1. Lack of disclosure (PCT Article 5)

1.1 Claims 24 to 33 relate to different uses for the sequences claimed in Claims 1 to 8 or for the methods claimed in Claims 9 to 17, inter alia for the development of therapeutic agents, the synthesis of genes or the prediction of reactivity to therapeutic agents. None of these types of use is so disclosed in the description that they can be performed by those skilled in the art without unreasonable effort. The description gives no information as to whether or how the sequence variants can be used for the purposes claimed. In addition it is completely unclear whether the **development** of therapeutic agents or agonists/antagonists actually leads to an effective therapeutic agent.

2. Lack of clarity (PCT Article 6)

2.1 Dependent claims can be appended only to claims in the same category of claim. However, the use Claims 27 to 29 are appended to process claims, and use Claim 33 is appended to product and process claims.

2.2 Use Claims 24 to 33 are defined solely by the

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III.

result to be obtained, without stating how this result can be obtained. They therefore merely state the problem to be solved.

2.3 The meaning of the term "intervention" in Claim 29 is not clear.

3. Due to the material objections under PCT Articles 5 and 6 it is not possible to perform a meaningful examination of novelty and inventive step for the said claims.

V. Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

| | | | |
|-------------------------------|--------|-------------------------|-----|
| Novelty (N) | Claims | 3-8, 11-16, 19-21, 23 | YES |
| | Claims | 1, 2, 9, 10, 17, 18, 22 | NO |
| Inventive step (IS) | Claims | 3-8, 11-16, 19-21, 23 | YES |
| | Claims | | NO |
| Industrial applicability (IA) | Claims | 1-23 | YES |
| | Claims | | NO |

2. Citations and explanations

The following documents are cited:

D1: TURKI J. ET AL.: "GENETIC POLYMORPHISMS OF THE BETA2-ADRENERGIC RECEPTOR IN NOCTURNAL AND NONNOCTURNAL ASTHMA", JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, Vol. 95, 1995, pages 1635-1641, XP002106242.

D2: LARGE V. ET AL.: "Human beta-2 adrenoceptor gene polymorphisms are highly frequent in obesity and associate with altered adipocyte beta-2 adrenoceptor function", JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, Vol. 100, No. 12, 1997, pages 3005-3013, XP002106243.

1. Claims 1, 2, 9, 10, 17, 18 and 22 are not novel (PCT Article 33(2)).

1.1 D1 (page 1636, Table 1) discloses the base exchanges A->G (position 1633), C->G (position 1666) and C->T (position 2078) in the sequence of the human beta-2 adrenergic receptor gene. D1 therefore inherently discloses the sequence of the human beta-2 adrenergic receptor gene, characterised in that

it contains the above-mentioned base exchanges.
Claims 1 and 2 therefore, insofar as they relate to the above-mentioned base exchanges, are not novel over D1.

1.2 D1 (page 1636, lefthand column, paragraph 3, to righthand column, paragraph 1; page 1637, righthand column, paragraph 2, lines 2 to 14, and Table 4) further discloses a correlation between the base exchange A->G (position 1633) and nocturnal asthma. From the teaching in D1 it would therefore be clear to those skilled in the art that the genotyping in position 1633 represents a method of determining a predisposition to nocturnal asthma. D1 therefore inherently discloses a method as claimed in **Claims 9, 10, 17 and 18** and is therefore prejudicial to the novelty of these claims.

1.3 The same arguments as in paragraph 2 also apply to the teaching of D2: D2 (abstract, lines 10 to 12; page 3006, lefthand column, paragraph 3; page 3008, lefthand column, last paragraph, lines 1 and 2, and Tables 1 and 2) discloses a correlation between the base exchange C->G (position 1666) and obesity. D2 is therefore prejudicial to the novelty of the subject matter of **Claims 1, 2, 9, 17, 18 and 22**.

2. Novelty and inventive step (PCT Article 33(2) and (3))

Sequences of the human beta-2 adrenergic receptor gene as claimed in Claims 3 to 8 and methods of determining predispositions to diseases as claimed in Claims 11 to 16, 19 to 21 and 23 are not

disclosed in the cited prior art, nor can they be inferred from it in an obvious manner. The said claims are therefore novel and appear to be inventive (PCT Article 33(2) and (3)) (but see Box VIII, paragraph 2).

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

Lack of clarity, lack of support in the description (PCT Article 6)

1. Independent Claim 9 is not clear. This claim does not contain the technical feature "human beta-2 adrenergic receptor gene" and therefore does not have a technical relationship with the remaining subject matter of the application, with the result that it does not meet the criterion of unity of invention under PCT Rule 13(1) and (2). In addition claim 9 does not state which of the "exchanged positions" should be genotyped. In examining this claim it was assumed that the "DNA of a proband" is the sequence of the human beta-2 adrenergic receptor gene and the "exchanged positions" are those positions stated in Claim 1 and in the description. These features must therefore be incorporated in the claim in order to overcome the objections.
2. The description (page 6, paragraph 1; page 7, lines 5 to 9, 15 to 19) discloses that the finding of **specific** base exchanges in **specific** positions in the human beta-2 adrenergic receptor gene may represent a method of determining **specific** predispositions to diseases. This specific teaching in the description contradicts the very broad wording of Claims 18 to 21 and 23. The subject matter of the said claims is therefore not fully supported by the description.
3. The phrase "predispositions to disease 9, 11 or 15" in Claim 16 is not clear.

09552719

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C. 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

| | |
|---|---|
| Date of mailing (day/month/year) 21 September 1999 (21.09.99) | |
| International application No. PCT/DE98/03818 | Applicant's or agent's file reference PCT/MDC 9803 |
| International filing date (day/month/year) 30 December 1998 (30.12.98) | Priority date (day/month/year) 30 December 1997 (30.12.97) |
| Applicant HOEHE, Margret et al | |

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

26 July 1999 (26.07.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

| | |
|---|------------------------------------|
| The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland | Authorized officer Diana Nissen |
| Facsimile No.: (41-22) 740.14.35 | Telephone No.: (41-22) 338.83.38 |

ATENT COOPERATION TR: TY

PCT/DE98/03818

09582719

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
DOCUMENT TRANSMITTED

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as designated Office

Date of mailing (day/month/year)
02 August 1999 (02.08.99)

International application No.
PCT/DE98/03818

International filing date (day/month/year)
30 December 1998 (30.12.98)

Applicant

MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN et al

The International Bureau transmits herewith the following documents and number thereof:

_____ cop(ies) of priority document(s) (Rule 17.2(a))

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Yolaine CUSSAC

Telephone No.: (41-22) 338.83.38



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

| | | |
|--|-----------|---|
| (51) International Patent Classification ⁶: C12Q 1/68 | A2 | (11) International Publication Number: WO 98/39477 (43) International Publication Date: 11 September 1998 (11.09.98) |
| (21) International Application Number: PCT/US98/03908 (22) International Filing Date: 26 February 1998 (26.02.98) (30) Priority Data: 08/811,441 3 March 1997 (03.03.97) US (71) Applicant: BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL [-/US]; 75 Francis Street, Boston, MA 02115 (US). (72) Inventors: DRAZEN, Jeffrey, M.; 99 Lawson Road, Winchester, MA 01890 (US). CHINCHILLI, Vernon, M.; 2925 Church Road, Elizabethtown, PA 17002 (US). MARTIN, Richard, J.; 5791 Ivanhoe Circle, Madison, WI 53711 (US). FORD, Jean, G.; 48 Rutgers Drive, Newark, NJ 07103 (US). FISH, James, E.; 1526 Monticello Drive, Gladwyne, PA 19035 (US). BOUSHEY, Homer; 35 El Verano Way, San Francisco, CA 94127 (US). (74) Agent: JARRELL, Brenda, H.; Choate, Hall & Stewart, Exchange Place, 53 State Street, Boston, MA 02109 (US). | | (81) Designated States: CA, JP, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Published <i>Without international search report and to be republished upon receipt of that report.</i> |
| (54) Title: DIAGNOSING ASTHMA PATIENTS PREDISPOSED TO ADVERSE β -AGONIST REACTIONS (57) Abstract <p>The present invention provides a novel method for identifying individuals who are likely to have negative responses to regular administration of β-agonists. The invention also provides kits useful for this purpose.</p> | | |

6197505

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

| | | | | | | | |
|----|--------------------------|----|--|----|--|----|--------------------------|
| AL | Albania | ES | Spain | LS | Lesotho | SI | Slovenia |
| AM | Armenia | FI | Finland | LT | Lithuania | SK | Slovakia |
| AT | Austria | FR | France | LU | Luxembourg | SN | Senegal |
| AU | Australia | GA | Gabon | LV | Latvia | SZ | Swaziland |
| AZ | Azerbaijan | GB | United Kingdom | MC | Monaco | TD | Chad |
| BA | Bosnia and Herzegovina | GE | Georgia | MD | Republic of Moldova | TG | Togo |
| BB | Barbados | GH | Ghana | MG | Madagascar | TJ | Tajikistan |
| BE | Belgium | GN | Guinea | MK | The former Yugoslav Republic of Macedonia | TM | Turkmenistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Greece | ML | Mali | TR | Turkey |
| BG | Bulgaria | HU | Hungary | MN | Mongolia | TT | Trinidad and Tobago |
| BJ | Benin | IE | Ireland | MR | Mauritania | UA | Ukraine |
| BR | Brazil | IL | Israel | MW | Malawi | UG | Uganda |
| BY | Belarus | IS | Iceland | MX | Mexico | US | United States of America |
| CA | Canada | IT | Italy | NE | Niger | UZ | Uzbekistan |
| CF | Central African Republic | JP | Japan | NL | Netherlands | VN | Viet Nam |
| CG | Congo | KE | Kenya | NO | Norway | YU | Yugoslavia |
| CH | Switzerland | KG | Kyrgyzstan | NZ | New Zealand | ZW | Zimbabwe |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | Democratic People's Republic of Korea | PL | Poland | | |
| CM | Cameroon | KR | Republic of Korea | PT | Portugal | | |
| CN | China | KZ | Kazakhstan | RO | Romania | | |
| CU | Cuba | LC | Saint Lucia | RU | Russian Federation | | |
| CZ | Czech Republic | LI | Liechtenstein | SD | Sudan | | |
| DE | Germany | LK | Sri Lanka | SE | Sweden | | |
| DK | Denmark | LR | Liberia | SG | Singapore | | |
| EE | Estonia | | | | | | |

5 *Immunol.* 75:173, 1995; Crane et al., *Thorax* 50:S5, 1995; McFadden, *J. Allergy Clin. Immunol.* 95:41, 1995). Reports of possible associations between β -agonist administration and increased morbidity, particularly for chronic β -agonist administration protocols, have spurred much debate over the safety of β -agonist therapy. There is a need to resolve this debate and to identify risks of deleterious or salutary effects
10 associated with administration of β -agonists to asthmatics.

Summary of the Invention

The present invention resolves the debate over the safety of β -agonist therapy and identifies a population of asthmatic patients who are at risk for an adverse reaction to
15 regular administration of β -agonists. In particular, the present invention provides the discovery that asthmatics who carry a particular allele of the β_2 -adrenergic receptor gene are more likely to have a negative response to chronic β -agonist therapy. The present invention provides methods of identifying individuals at risk for an adverse response to β -agonist treatment, and also provides diagnostic kits useful in the practice of such methods.

20 In preferred embodiments of the methods of the present invention, a genomic nucleic acid sample is provided from an individual, first and second β_2 -adrenergic receptor gene alleles are identified within the genomic nucleic acid sample, and any individual for whom both the first and second β_2 -adrenergic receptor gene alleles encode Arg at residue 16 is classified as being at risk for adverse reaction to chronic β -agonist
25 administration. The particular method by which the β_2 -adrenergic receptor gene alleles are identified within the genomic sample is not intended to limit the scope of the present

5 invention. However, preferred identification methods include allele-specific polymerase chain reaction (PCR) techniques and direct sequencing techniques.

Preferred kits provided by the practice of the present invention include reagents useful for performing the inventive methods, which reagents are assembled together in a container for ease of use.

10

Description of the Drawings

Figure 1 depicts the primary amino acid sequence and known polymorphic sites in the human β_2 -adrenergic receptor protein. Nine polymorphic sites are shown; those shown in black represent different gene alleles that encode the same residue, whereas
15 those in white that are labeled with alternate amino acids represent gene alleles that result in residue substitutions.

Figure 2 is a photograph of an agarose gel presenting genotype analyses of six BAGS patients at residue 16 of the β_2 adrenergic receptor.

Figure 3 has panels A and B, showing the morning and afternoon peak expiratory
20 flow rates (PEFR), respectively, of asthmatics who received regularly- scheduled or as-needed albuterol treatments. In each panel, the results are plotted by β_2 -adrenergic receptor genotype. Data from asthmatics who are homozygous for the β_2 -adrenergic receptor Arg16 variant are plotted either as a solid line punctuated with diamonds (those who received regular treatment) or a gray line punctuated by squares (those who received
25 as-needed treatment); data from Gly16 homozygotes who received regular treatment are plotted as a light gray line punctuated by triangles; data from Arg16/Gly16 heterozygotes are plotted as light gray line punctuated by Xs.

5

Description of the Sequences

SEQ ID NO:1 presents an amino acid sequence of the β_2 -adrenergic receptor. In SEQ ID NO:1, Arg, Gln, Val, and Thr are located at positions 16, 27, 34, and 164, respectively. Known gene polymorphisms produce β_2 -adrenergic receptors with Gly, Glu, 10 Met, and Ile, respectively, at these positions (see Figure 1).

SEQ ID NO:2 presents a human β_2 -adrenergic receptor gene encoding the protein of SEQ ID NO:1. The Arg16 \rightarrow Gly polymorphism described above with respect to SEQ ID NO:1 can be produced by substituting a G for the A at SEQ ID NO:2 position 1633; the Gln 27 \rightarrow Glu polymorphism can be produced by substituting a G for the C at 1666.

15

Description of Preferred Embodiments

The human gene for the β_2 -adrenergic receptor has been cloned (Kobilka et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:46, 1987) and extensively studied. Nine gene polymorphisms have been identified in the general population, four of which result in 20 amino acid substitutions (the other five are silent changes) (see Figure 1; see also, Reihnsaus et al., *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 8:334, 1993). The present invention relates to the "Arg16 \rightarrow Gly" polymorphism depicted in Figure 1.

Various studies have been undertaken to identify any significance of the Arg16 \rightarrow Gly polymorphism in asthma (for review, see Liggett, Chapter 21, *The Genetics of Asthma* [Liggett et al., eds], Marcel Dekker, NY, 1996). No general association 25 between either the Arg16 or the Gly16 allele and asthma has been observed (Reihnsaus et al., *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 8:334, 1993). Also, the Arg16 and the Gly16

5 proteins have been shown to have equivalent affinities for agonists and antagonists, and to couple normally to G_i (Green et al., *Biochemistry* 33:9414, 1994).

The only difference observed prior to the present invention between the Arg16 and Gly16 allele was enhanced down regulation of the Gly16 allele in response to β -agonist administration (Green et al., *Biochemistry* 33:9414, 1994). This finding prompted one expert in the field to conclude that:

"the Gly16 variant, which undergoes the greatest degree of agonist promoted down regulation, would be expected to display an overall reduced level of expression as compared with [the Arg16 variant]. Under this scenario, basal bronchomotor tone might be decreased or bronchial hyperactivity increased. . . . Responsiveness to β -agonist may also be depressed in asthmatics harboring [the Gly16] polymorphism. . . . During chronic agonist therapy, the potential for tachyphylaxis would appear to be greatest with the Gly16 variant. . . . Given reports that suggest a relationship between 'overuse' of β -agonists and adverse outcomes in asthma, it seems prudent to consider that tachyphylaxis may occur in some individuals"

(citations omitted; Ligget, Chapter 21, *The Genetics of Asthma* (Ligget et al., eds), Marcel Dekker, NY, 1996, pg. 470). Thus, prior to the present invention, the state of knowledge concerning the Arg16 \rightarrow Gly polymorphism in the human β_2 -adrenergic receptor indicated that individuals carrying the Gly16 allele might suffer more tachyphylaxis in response to chronic β -agonist therapy, and therefore might be more susceptible to adverse responses to β -agonist administration.

5 Surprisingly, the present invention provides the discovery that the opposite is true: individuals carrying the Gly16 allele of the human β_2 -adrenergic receptor are actually *less* susceptible to adverse responses to β -agonist administration. According to the present invention, individuals who are homozygous for the Arg16 allele are more likely to have an adverse response to β -agonist therapy than either Gly16 homozygotes or Gly16/Arg16
10 heterozygotes.

As described in Example 2, we analyzed the β_2 -adrenergic receptor genotype in 179 subjects who had participated in a study testing their response to regular and as-needed albuterol administration (Drazen et al., *New Eng. J. Med.* 335:841, 1996, incorporated herein by reference; see also Example 1). That study had concluded that "in
15 patients with mild asthma, neither deleterious nor beneficial effects derived from the regular use of inhaled albuterol beyond those derived from the regular use of the drug as needed (Drazen et al., *id.*). When we examined the β_2 -adrenergic receptor genotype in the study participants, however, we came to a rather different conclusion. Figure 2 shows our findings: individuals who carry two copies of the Arg16 β_2 -adrenergic
20 receptor allele showed significant decreases in peak expiratory flow rate (PEFR) after receiving regular β -agonist therapy for 16 weeks. Gly16 homozygotes and Arg16/Gly16 heterozygotes did not show this effect. Arg16 homozygotes who received β -agonist treatments on an as-needed basis showed more modest decreases in PEFR and these decreases were only temporary.

25 By demonstrating a correlation between adverse response to chronic β -agonist therapy and the presence of (two copies of) the Arg16 β_2 -adrenergic receptor allele, the present invention provides methods for identifying asthmatic patients at risk of such an

5 adverse response. Quite simply, patients are screened to identify the β_2 -adrenergic
receptor alleles they carry; those who are homozygous for Arg16 are identified as
susceptible. Any available method can be used to detect patients' β_2 -adrenergic receptor
genotype (see, for example, Examples 2 and 3; see also methods described in *Current*
10 *Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, Unit 9, incorporated herein by
reference).

For example, the relevant region of each patients' β_2 -adrenergic receptor gene
(both alleles) can be directly sequenced according to known techniques. Alternatively or
additionally, techniques such as denaturing gradient gel electrophoresis, allele-specific
polymerase chain reaction (PCR), allele-specific hybridization, allele-specific ligation
15 amplification (see, for example, English et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 9:360, 1994,
incorporated herein by reference), single strand conformation polymorphism analysis,
restriction fragment length polymorphism analysis, or any other available technique useful
to distinguish sequence polymorphisms may be employed. Allele-specific PCR
techniques, such as the amplification refractory mutation system (ARMS), or
20 amplification followed by sequencing, are preferred methods of polymorphism detection.
Preferred hybridization methods include hybridization to oligonucleotides on a silica chip
array (see, for example, Hacia et al, *Nature Genetics* 14:441, 1996, incorporated herein
by reference; see also *Nature Genetics* 14:367, 1996).

The present invention also provides kits for identifying asthma patients susceptible
25 to adverse responses to chronic β -agonist administration. Preferred kits comprise reaction
components useful for allele-specific PCR techniques. For example, particularly
preferred kits include primer sets capable of amplifying and distinguishing the Arg16 and

- 5 Gly16 alleles, and may also include buffers, thermalstable reverse transcriptase, control templates, etc. Alternative preferred kits include amplification reagents that are not necessarily allele-specific, in combination with sequencing reagents.

Examples

10

EXAMPLE 1

Analysis of Beneficial and Deleterious Effects of Regularly-Scheduled and As-Needed

Albuterol Administration in Patients with Mild Asthma

(see Drazen et al., *NEJM* 335:841, 1996, incorporated herein by reference)

Materials and Methods

15

PATIENT RECRUITMENT: Patients with mild asthma, as defined by the criteria

shown in Table 1, were recruited from existing study populations and by advertising.

Eligible patients entered a six-week single-blind run-in period, during which they used a placebo inhaler on a regular basis (two inhalations four times a day) and took

supplemental puffs of open-label albuterol as needed. During the run-in period, patients

20

were evaluated three times at two-week intervals, at which time asthma control was

assessed by the review of a number of criteria.

25

| TABLE 1 CHARACTERISTICS USED TO DEFINE MILD ASTHMA* | |
|--|--|
| CHARACTERISTIC | ALLOWABLE RANGE |
| FEV ₁ † | ≥ 70% of predicted value |
| Age | 12 to 55 yr |
| PC ₂₀ | ≤ 16 mg/ml |
| Use of β-agonists | 6 to 56 puffs of albuterol/wk; patients using less than 6 puffs of albuterol/wk at visit 1 had to have a PC ₂₀ of ≤ 8 mg/ml |

5

| | |
|---|--|
| Use of other asthma medications | None, no corticosteroids for 6 wk |
| Other serious medical conditions, including pregnancy | Not allowed |
| Smoking | None in past year, maximal history of 5 pack-years permitted |

10

*FEV₁ denotes forced expiratory volume in one second, and PC₂₀, the concentration of methacholine required to decrease the FEV₁ by 20 percent.

†The FEV₁ was measured after at least eight hours without bronchodilator medications.

15

20

25

PATIENT SELECTION: Patients were randomly assigned to a treatment group if over the six-week period their asthma was clinically stable and they demonstrated their ability to comply with the study procedures, as indicated by the regular use of the placebo inhaler (monitored by a Chronology recording device) and their ability to record their peak flow (twice daily, using a Mini-Wright peak-flow meter) (Clement Clarke, Columbus, OH) and asthma symptoms once daily in a diary. The treatments assigned consisted of either inhaled albuterol on a regular basis (two inhalations four times a day) plus albuterol as needed or inhaled placebo on a regular basis (two inhalations four times a day) plus albuterol as needed. Albuterol and placebo inhalers were generously supplied by Schering-Plough (Memphis, TN). Patients were instructed to have their regularly scheduled inhalations in the morning after recording their morning peak flow, at midday, in the late afternoon, and on retiring to sleep after recording their evening peak flow. They were instructed to allow at least four hours between their regularly scheduled inhalation in the late afternoon and the recording of their evening peak flow.

PATIENT TREATMENT: Over the ensuing 16 weeks, while patients received blinded treatment, the control of asthma was monitored daily, through peak flow rates and symptoms recorded by patients, as well as during clinic visits, which were scheduled every two to three weeks. At the completion of the randomized-treatment period, all the

5 patients were switched to single-blind treatment with inhaled placebo for a four-week withdrawal period; during this time patients continued to use open-label albuterol as needed.

Seven outcome indicators were monitored: peak flow, the symptom record, quality of life, the change in the forced expiratory volume in one second (FEV₁) in response to an inhaled bronchodilators, the concentration of methacholine required to decrease the FEV₁ by 20 percent (PC₂₀), asthma exacerbations, and treatment failure. Peak flow, the primary outcome indicator, was measured twice daily by patients using a Mini-Wright peak-flow meter; the best of three efforts was recorded. Patients recorded their asthma symptoms and the number of puffs of supplemental albuterol used daily. Asthma symptoms were recorded on a 4-point scale, with 0 representing no symptoms and 3 representing severe symptoms. Asthma-specific quality-of-life scores were recorded during clinic visits, with an instrument validated by other investigators (Juniper et al., *Thorax* 47:76, 1992). To determine the spirometric response to an inhaled bronchodilator, the difference in the FEV₁ before and 15 minutes after two inhalations of albuterol was measured (and reported as percent improvement) during clinic visits when responsiveness to methacholine was not tested.

Patients refrained from taking their study medications for at least eight hours before all clinic visits. To measure PC₂₀ for methacholine, methacholine aerosols were generated with a nebulizer (model 646, DeVilbiss Health Care, Somerset, Pa.) and a calibrated dosimeter (S&M Instruments, Dovestown, PA). The PC₂₀ for methacholine was determined by standard procedures (Tashkin et al., *Am. Rev. Respir. Dis.* 145:301, 1992). Asthma exacerbations were monitored during each clinic visit; patients were

5 asked about their asthma control, and all asthma exacerbations were recorded. An asthma
exacerbation was defined as an increase in symptoms of cough, chest tightness, or
wheezing in association with one or more of the following; an increase over the base-line
use of supplemental β -agonist treatments of 8 or more puffs per 24 hours for a period of
48 hours, the use of 16 or more puffs of a supplemental β -agonist per 24 hours for a
10 period of 48 hours, or a fall in peak flow of 35 percent or more from the best three-day
average (morning and evening) during the run-in period.

Treatment was considered to have failed if patients who had asthma exacerbations
and were treated with increased doses of β -agonists did not respond adequately — that is,
if they continued to meet the criteria for exacerbation. Such patients were treated with a
15 short course of prednisone, as determined by their physicians; their data continued to be
collected, and they remained in the trial (in accordance with the intention-to-treat
method).

STANDARDIZATION AND QUALITY-ASSURANCE TECHNIQUES: All clinical laboratory
tests — that is, measurements of lung function, skin testing for allergies, methacholine
20 challenges, and quality-of-life assessments — were performed at each center with the use
of equipment and procedures that were standardized for the entire network. Workers
participating in the network were tested to ensure proficiency and uniformity in all
network-related skills and had to pass certification examinations before the data they
gathered could be used in the network. All results of spirometric testing (Collins Eagle 2
25 spirometer, Quincy, MA), including that for the methacholine challenge, were confirmed
by a single network member. Peak-flow meters were tested against spirometers during
each clinic visit and were replaced if they failed to meet previously established

5 performance standards. A distributed data-entry system allowed each clinical center to submit its data over the Internet directly to the Data Coordinating Center. The Data Coordinating Center entered the data a second time to verify it.

COMPLIANCE: Each patient was given a digital wristwatch with multiple alarms to improve treatment compliance. In addition, Chronology recording devices were used
10 with the randomly assigned metered-dose inhalers to provide an electronic record of the date and time of inhaler use.

STATISTICAL ANALYSIS: Morning peak flow was chosen as the primary outcome variable for the calculation of sample size. A Minimum of 200 patients made it possible to detect a difference of 25 liters per minute between groups with 80 percent statistical
15 power. A goal of recruiting 250 randomized patients was established on the assumption that the dropout rate would be less than 20 percent. This sample size also provided 80 percent statistical power to detect a difference of 0.19 liter in FEV₁ and 0.70 doubling dilution in the PC₂₀ values for methacholine.

Response variables — that is, peak-flow values, medication use, and asthma
20 symptoms — from the patients' diary cards were averaged each week. Because of the longitudinal nature of most of the response variables, a mixed-effects linear model was applied (Vonesh et al., *Biometrics* 43:617, 1987; Laird et al., *Stat Methods Med Res* 1:225, 1992); this approach allowed all data obtained to be used, not just the data obtained at a single visit. For each response variable, a segmented linear model was
25 fitted with an intercept and with slopes for the last 4 weeks of the run-in period, the first 5 weeks of the treatment period, the remaining 11 weeks of the treatment period, and the withdrawal period. The "break point" after five weeks of randomized treatment was

5 chosen on the basis of rates of asthma exacerbation reported by Sears et al. (Sears et al.,
Lancet 336:1391, 1990).

For each outcome measure, values were calculated from the models for the end of
the run-in period, for the end of the double-blind-treatment period, and for the end of the
withdrawal period. This statistical model was determined before the start of the study,
10 and therefore other models were not considered during data analysis. The groups were
compared with respect to rates of treatment failure with the use of Fisher's exact test. To
ensure patient safety, an interim analysis was conducted after approximately 40 percent of
the randomized patients had completed the trial or withdrawn consent; as a result of this
analysis, the P value considered to indicate statistical significance was reduced from 0.05
15 to 0.03 for the final analyses (Pocock, *Biometrics* 38:153, 1982; Geller et al., *Biometrics*
43:213, 1987).

Results

ENROLLMENT AND RETENTION: Of the subjects recruited, 255 were eligible for
20 enrollment at the end of the six-week run-in period and were randomly assigned to
receive double-blind treatment (Table 2). There were no significant differences between
the treatment groups with respect to any of the indexes monitored. During the period of
randomized treatment and withdrawal, 25 subjects dropped out of the trial — 10 in the
scheduled-treatment group and 15 in the treatment-as-needed group. Two hundred thirty
25 patients completed the entire trial.

| |
|--|
| TABLE 2 CHARACTERISTICS OF PATIENTS IN THE TWO TREATMENT GROUPS |
|--|

| CHARACTERISTIC* | ALBUTEROL TREATMENT† | |
|--|--------------------------------|---------------------------|
| | REGULARLY SCHEDULED (n=126) | AS-NEEDED ONLY (N=129) |
| Male sex — no. (%) | 57 (45.2) | 55 (42.6) |
| Minority racial or ethnic group — no. (%)‡ | 41 (32.5) | 43 (33.3) |
| Atopy — no. (%) | 122 (96.8) | 127 (98.4) |
| Age — yr | 28.6±9.0 | 29.3±9.2 |
| Age <18 yr — no. (%) | 16 (12.7) | 10 (7.8) |
| Morning peak flow — liters/min§ | 418.3±100.5 | 421.6±99.8 |
| Evening peak flow — liters/min§ | 437.6±101.5 | 440.7±99.1 |
| Peak-flow variability — %§¶ | 3.9±5.7 | 3.7±6.9 |
| Symptom score§ | 0.46±0.40 | 0.38±0.34 |
| No. of supplemental puffs of β - agonist per day§ | 1.5±2.0 | 1.7±2.2 |
| FEV ₁ — liters¶ (% of predicted value)** | 3.1±0.74 (89.0±12.7) | 3.15±0.68 (91.4±13.9) |
| Quality-of-life score***†† | 2.28±0.82 | 2.44±0.82 |
| PC ₂₀ — mg/m***‡‡ | 0.64±1.82 | 0.64±1.82 |
| FEV ₁ response to albuterol inhalation — % change from base line §§ | 10.5±8.3 | 10.8±9.2 |

*FEV₁ denotes forced expiratory volume in one second, and PC₂₀ the concentration of methacholine required to decrease the FEV₁ by 20 percent.

†Plus-minus values are means ±SD unless otherwise indicated.

‡Fifty-nine percent of the minority patients in the scheduled group were black, and 65 percent in the as-needed group were black.

§Values represent averages for the last four weeks of the run-in period.

¶Peak-flow variability was calculated as (evening peak flow — morning peak flow) ÷ evening peak flow) x 100.

|| Asthma symptoms were graded by the patient each day, from 0 for no symptoms to 3 for incapacitating symptoms.

**This characteristic was measured from week 6 of the run-in period.

††Asthma-specific quality-of-life questionnaires were completed by the patients during clinical-center visits. A score of 1.0 indicates that asthma had no effect on the overall quality of life; a score of 2.0, that the patient's life was "a little limited" by asthma; a score of 3.0, that there was "some limitation"; and a score of 7.0, that there was "total limitation."

‡‡Values are medians and interquartile ranges.

§§Data are the averages from weeks 2 and 4 of the run-in period.

5 COMPLIANCE: Compliance with the use of inhaled medication, either active or placebo, on a regular basis was greater than 80 percent, as indicated by Chronolog treatment records and an analysis of diary cards. Of the 3172 scheduled visits to patients' clinical center, 26 were missed, for a rate of compliance of over 99 percent.

10 ASTHMA EXACERBATIONS: Asthma was exacerbated 24 times (11 times in the scheduled-treatment group and 13 times in the treatment-as-needed group) during the active treatment period and 4 times during the withdrawal period (twice in each treatment group). The 28 exacerbations occurred in 12 patients in the scheduled-treatment group and 11 patients in the treatment-as-needed group.

15 TREATMENT FAILURES: Treatment was considered to have failed in 11 patients during the 16-week period of randomized treatment (5 in the scheduled-treatment group and 6 in the treatment-as-needed group) and in 2 during the withdrawal period (both in the scheduled-treatment group). There were three visits to the emergency room for asthma (two in the scheduled-treatment group and one in the treatment-as-needed group). No patients were hospitalized for asthma during the trial, and none died. There were no
20 significant differences in any of the event rates between the two treatment groups.

EFFICACY OUTCOMES: Lung function (indicated by morning peak flow, evening peak flow, peak-flow variability, FEV₁, β -agonist responsiveness, and PC₂₀) and asthma symptoms (determined by the number of uses of the supplemental β -agonists metered-dose inhalers, diary scores and quality-of-life scores) as derived from the regression analysis
25 performed for each patient group are shown in Table 3. Graphic displays of values predicted by the model as compared with sample means showed excellent goodness of fit by the statistical model (data not shown). There were no significant differences in

5 morning peak flow between the two treatment groups (Table 3). Even though the average use of albuterol was 9.3 puffs per day in the scheduled-use group and 1.6 puffs per day in the treatment-as-needed group, the extra use of medication did not lead to differences in peak-flow variability, FEV₁, supplemental albuterol use, asthma symptoms, quality of life, or PC₂₀.

10 Two significant differences were found between the groups. Once was in the change in evening peak flow from the end of the treatment period to the end of the withdrawal period; mean evening peak flow fell 17.7 liters per minute in the scheduled-treatment group but increased 1.3 liters per minute in the treatment-as-needed group. The other significant difference was in the change in bronchodilator responsiveness between
15 the run-in period and the treatment period (Table 3). The FEV₁ response to treatment with albuterol increased from a 10.7 percent improvement to a 12.5 percent improvement in the scheduled-treatment group and decreased from a 10.7 percent improvement to a 9.2 improvement in the treatment-as-needed group. A number of small but statistically significant changes within the groups were noted among the various treatment periods, as
20 shown in Table 3. Results of the analysis in which data collected after the subjects in whom treatment was considered to have failed were excluded were essentially the same as those derived with the use of the intention-to-treat method.

25

| TABLE 3 MODEL ESTIMATES (USING INTENTION-TO-TREAT DATA) FOR THE END OF THE RUN-IN PERIOD (WEEK 6), THE END OF THE ACTIVE-TREATMENT PERIOD (WEEKS 22), AND THE END OF THE WITHDRAWAL PERIOD (WEEK 26).* | | | | | | |
|--|---------------------|-----------|------------------------|-----------|-------------------------|-----------|
| OUTCOME† | AFTER RUN-IN PERIOD | | AFTER TREATMENT PERIOD | | AFTER WITHDRAWAL PERIOD | |
| | SCHEDULED | AS NEEDED | SCHEDULED | AS NEEDED | SCHEDULED | AS NEEDED |

| | | | | | | |
|----|-----------------------------|-------|-------|-------------------|-------|-------------------------------|
| 5 | Peak flow (liters/min) | | | | | |
| | Morning | 415.9 | 424.1 | 414.4 | 424.5 | 414.8 |
| | Evening | 436.3 | 441.1 | 441.3 | 445.2 | 433.6 P=0.005‡ P=0.021§ |
| 10 | Peak-flow variability (%)† | 4.1 | 3.2 | 5.7 P<0.001 | 4.3 | 4.0 P<0.001‡ |
| | FEV ₁ (liters) | 3.09 | 3.13 | 3.04 | 3.12 | 3.06 |
| | Albuterol response (%)** | 10.7 | 10.7 | 12.5 P=0.005†† | 9.2 | |
| 15 | Extra albuterol (puffs/day) | 1.4 | 1.6 | 1.3 | 1.6 | 1.6 P=0.013‡ |
| | Symptom score‡‡ | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 |
| 20 | Quality-of-life score‡‡ | 2.3 | 2.4 | 2.3 | 2.3 | 2.1 P=0.003‡ P=0.006§§ |
| | PC ₂₀ (mg/ml) | 0.73 | 0.73 | 0.56 p=0.013 | 0.72 | 0.66 P=0.008 §§ |

*Values differ from those in Table 2 because Table 2 contains the mean data rather than estimates from the model.

†FEV₁ denotes forced expiratory volume in one second, and PC₂₀ the concentration of methacholine required to decrease the FEV₁ by 20 percent.

‡P value is for the within-group comparison of the response at the end of the treatment period with that at the end of the withdrawal period.

§P value is for the comparison between groups of the change in response from the end of the treatment period to the end of the withdrawal period.

§Peak-flow variability was calculated as [(evening peak flow — morning peak flow) ÷ evening peak flow] x 100 (Martin et al., *Am. Rev. Respir. Dis.* 143:351, 1991).

|| P value is for the within-group comparison of the response at the end of the treatment period with that at the end of the run-in Period.

**Bronchodilator response was last measured during the run-in period at week 4 and during the active-treatment period at week 20.

††P value is for the comparison between groups of the change in response from the end of the run-in period to the end of treatment period.

‡‡See the footnotes to Table 2 for an explanation of the scoring system.

§§P value is for the within-group comparison of the response at the end of the run-in period with that at the end of the withdrawal period.

5 These results show that regular use of inhaled albuteral in patients with mild asthma is not generally associated with a deleterious effect on asthma control.

EXAMPLE 2

Correlation of β_2 -Adrenergic Receptor Allele with Outcome of β -Agonist Administration

10 *Materials and Methods:*

 GENERALLY: The patients analyzed in the present study had been participants in a β -agonist study, referred to as BAGS, sponsored by the Asthma Clinical Research Network of the United States National Heart, Lung and Blood Institute (ACRN). The results of that study are published in the *New England Journal of Medicine* (Drazen et al., 15 *NEJM* 335:841, 1996, incorporated herein by reference); relevant portions of the Materials and Methods and Results sections of that paper are reproduced in Example 1. As noted above, that study concluded that, overall, no negative effects were associated with regular administration of albuterol to mild asthmatics.

 We decided to further analyze the results of the BAGS trial by investigating the 20 genotype of study participants' β_2 -adrenergic receptor gene (encoding residue 16 of the protein). We were able to obtain materials for determining each patient's genotype for 179 of the 255 subjects. The remaining subjects either refused to participate or could not be located for genotyping.

 ARMS ASSAY: The primers used to detect the β_2 -adrenergic receptor gene 25 polymorphism (corresponding to an A \rightarrow G substitution at nucleotide 1633 of SEQ ID NO:2) (A \rightarrow G) that gives rise to the Arg 16 \rightarrow Gly amino acid change in the protein were: Wild-type forward primer A1 (5'-GCCTCTTGCTGGCACCCAA-AA-3' [SEQ ID

5 NO:3]) corresponding to nucleotides 1612-1633, except the penultimate base at the 3' end (underlined) was changed from T to A, polymorphism-specific forward primer A2 (5'-GCCTTCTTGCTGGCACCCAA**A**G-3' [SEQ ID NO:4], differs from the wild-type primer at the last nucleotide at 3' end (shown in bold), reverse primer Rev (5'-AGGATAACCTCATCCGTAAGG-3' [SEQ ID NO:5]) corresponding to nucleotides
10 2483-2503 on the complementary strand.

The primers used to detect the β_2 -adrenergic receptor gene polymorphism (corresponding to a C \rightarrow G substitution at nucleotide 1666 of SEQ ID NO:2) that gives rise to the Gln27 \rightarrow Glu amino acid change in the protein were: Wild-type forward primer B1 (5'-CCGGACCACGACGTCACGCA**A**C-3' [SEQ ID NO:6] corresponding to
15 nucleotides 1645-1666, except the penultimate base at the 3' end (underlined) was changed from G to A, polymorphism-specific forward primer B2 (5'-CCGGACCACGACGTCACGCA**A**G-3' [SEQ ID NO:7]), differs from the wild-type primer at the last nucleotide at 3' end (shown in bold), and reverse primer Rev.

Amplification by PCR of the genomic DNA of each sample included two reactions
20 for each assay separately: one with wild type primers (A1 and REV) and the other with polymorphic (A2 and Rev) allele-specific primer set for polymorphism detection at nucleotide 16633 and wild type primers (B1 and Rev) and the polymorphic allele-specific primer set (B2 and Rev) for polymorphism detection at nucleotide 1666. Both polymorphism detection assays included human β -globin primer sets as positive controls
25 in the PCR reaction mix. The primers for β -globin were: Forward primer BG1 (5'-GCTGTCATCACTTAGACCTC-3' [SEQ ID NO:8] corresponding to nucleotides 43-62 (Genbank accession no. L48217), reverse primer BG2 (5'-

- 5 CAGACGAATGATTGCATCAG-3' [SEQ ID NO: 9]) corresponding to nucleotides 766-785 on the complementary strand (Genbank accession no. L48217).

Each PCR reaction contained 5 μ l template DNA (buccal cell lysate or 100-200 ng of blood genomic DNA), PCR buffer II (Perkin Elmer), 1.5mM MgCl₂ (Perkin Elmer), 12.5 pmoles of each primer, 400 μ M dNTPs (Perkin Elmer), 0.625 units of Taq
10 polymerase (AmpliTaq polymerase, Perkin Elmer), 0.05 units of Perfect Match PCR enhancer (Stratagene) in a total volume of 25 μ l. Conditions for PCR were: an initial hot start period of 5 min at 94°C, and temperature was hold at 80°C after the hot start during this period dNTPs and Taq polymerase were added. This was followed by 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 58°C, 1 min at 72°C, with a final extension time of 5 min at 72°C.
15 Thin walled 96 micro-well plates (Costar) were used with mineral oil for amplification reactions, in a PTC-100 thermal cycler (MJ Research, Watertown, MA). After amplification, about 20 μ l of reaction mixture was resolved by electrophoresis on a 2.0% agarose gel and stained with ethidium bromide for analysis.

20 **Results**

Figure 3 presents an example of the results we achieved in our genotype analysis of BAGS subjects. The overall findings for this residue are at β_2 -adrenergic receptor residue 16 summarized below in Table 4:

25

| TABLE 4 GENOTYPE OF BAGS STUDY PARTICIPANTS AT PROTEIN RESIDUE 16 | | | | |
|--|----|----|----|-------|
| RACE | AA | AG | GG | TOTAL |
| African American | 7 | 12 | 11 | 30 |
| Hispanic | 2 | 9 | 3 | 14 |

5

| | | | | |
|----------------|----|----|----|-----|
| Other Minority | 1 | 4 | 4 | 9 |
| Non-Minority | 18 | 64 | 44 | 126 |
| Total | 28 | 89 | 62 | 179 |

10 These data indicate an allele frequency of 0.405 for Arg 16, so that one would expect approximately 16% of the population to be homozygous for this allele.

Having determined the β -adrenergic receptor genotype of BAGS participants, we then re-analyzed the BAGS data, stratifying it by the genotype of the individuals in the various treatment groups. Our results are shown in Figure 3. As can be seen,

15 individuals who are homozygous for the Arg16 had an adverse response to the regular use of inhaled β -agonists, as indicated by a decrease in peak flow of 22.5 LPM between the end of the placebo "run-in" period and the end of the "withdrawal" period. By contrast, Arg16 homozygotes who received as-needed β -agonist treatment had a slight increase in peak flow over this interval. Gly16 homozygotes and Arg16/Gly16 heterozygotes treated
20 with regularly-scheduled β -agonist administrations, did not display any adverse effects.

These data indicate that the genotype at position 16 of the β_2 -adrenergic receptor provides strong predictive information about the likely response of the patient to regularly-scheduled β -agonist treatment. The change in peak flow rate after regularly-scheduled albuterol treatment was significantly different over the interval between the end of the run
25 period and the end of the withdrawal period in individuals homozygous for the Arg16 allele as compared with those having the Gly16/Gly16 or Arg16/Gly16 genotypes (p=0.0019 for AM PEF; p=0.0009 for PM PEF).

5 We note that all of the β -agonist-sensitive Arg16 homozygotes that we analyzed were also homozygous for Gln27, but other Gln27 homozygotes did not have adverse responses to β -agonists. Accordingly, we conclude that Gln27 is not likely to be an indicator, by itself, of susceptibility to adverse β -agonist responses.

10

EXAMPLE 3

Preferred Methods of Detecting β_2 -Adrenergic Receptor Alleles

Generally:

As will be readily appreciated by those of ordinary skill in the art, any of a variety of techniques may be used to detect β_2 -adrenergic receptor alleles in order to identify
15 patients susceptible to a negative response to β -agonist administration in accordance with the present invention. The present Example is intended only to provide certain preferred examples of possible methods, and is not intended to limit the scope of the present invention.

20

Temperature Gradient Gel Electrophoresis:

GENERALLY: A temperature gradient gel electrophoresis method for detection of β_2 -adrenergic receptor gene polymorphisms has been described (Reihnsaus et al., *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 8:334, 1993, incorporated herein by reference). Basically, a gradient of denaturing solvent in a polyacrylamide gel is employed to separate nucleic
25 acid fragments that differ in sequence by only a single base pair (see, for example, Wartell et al., *Nuc. Acids Res.* 18:2699, 1990, incorporated herein by reference).

5 GEL ELECTROPHORESIS: Temperature-gradient gel electrophoresis can be carried out with a vertical acrylamide slab-gel apparatus, modified from a conventional vertical gel apparatus so that the glass plates containing the acrylamide gel are sandwiched between two aluminum heating blocks. Channels in the blocks allow circulating fluid to establish a temperature gradient from the top to bottom or from one side to the other.

10 The channels running across the top and bottom are used to establish a temperature gradient in the same direction as electrophoretic migration. For a gradient perpendicular to DNA migration the fluid flows along the sides. Adhesive pipe tape is used to insulate the surfaces of the blocks not facing the glass. The rear block is placed against the main vertical support of the gel unit in the space formed by the overhanging upper buffer

15 chamber. Both heating blocks rest on U-shaped plexiglass pieces which keep them above the buffer in the lower electrolyte chamber. Two thermostated fluid circulators (Haake Inc.) are employed to control the high and low temperatures.

 The temperature gradient produced by the heating blocks is preferably checked for linearity and uniformity at least two temperature settings of the water circulators (e.g.,

20 32°C/28°C and 44°C/18°C). A thermistor probe ($\pm 0.5^\circ\text{C}$) can be inserted into a gel to determine the gel temperatures at different depths and horizontal positions. For all temperature settings, the gradient in the gel is preferably linear and uniform within the region covered by the blocks. The appropriate percent acrylamide gel is determined according to standard practice. Such gels should be prepared in a denaturing solvent

25 (e.g., 0.5M TBE, 7.0M urea, 40% formamide u/u) gels are loaded and according to standard procedures.

5 CALCULATION OF THERMAL STABILITY PROPERTIES: The model of the DNA helix-coil transmission can be used to calculate the thermal denaturation behavior of the DNA fragments (see Wartell et al., *Nuc. Acids Res.* 18:2699, 1990, and references cited therein). In addition to predicting the melting curve for a given DNA sequence, the calculation can also produce melting profiles for the base pairs in a DNA sequence. A
10 melting profile displays the probability that the n^{th} base pair of the sequence is melted, $\theta(n)$, at a given temperature. From a three dimensional display of melting profiles at a series of temperatures the lengths and locations of cooperatively melting domains can be visualized. The calculation of the melting profiles assumes that strand dissociation is negligible.

15 The nearest neighbor stacking parameters can be obtained from McCampbell et al. (*Biopolymers* 28:1745, 1989), and Gotoh and Tagashira (*Biopolymers* 20:1033, 1981). All other parameters, such as the loop entropy factor, strand dissociation parameters, etc. can be obtained from McCampbell et al. (*Biopolymers* 28:1745, 1989). When only the first melting domain is of concern the dissociation parameters and loop entropy terms do
20 not significantly influence theory-experiment comparisons. Extrapolations may be required to normalize the calculations to the solvent conditions utilized in the above-cited parameter references. For example, the Gotoh and Tagashira parameters, determined in 0.02M Na⁺, can be extrapolated to 0.1 M Na⁺ by scaling T_{AT} and T_{GC} , the average T_m 's of AT and GC base pairs (Vologodskii et al., *J. Biomole Struct. Dynam.* 2:131, 1984).

25

Allele-Specific PCR:

5 GENERALLY: One preferred method for identifying β_2 -adrenergic receptor gene polymorphisms in order to practice the present invention is to perform polymerase chain reactions (PCR) using primers whose 3'-most nucleotide is mismatched with respect to either the Arg 16 allele or the Gly 16 allele (see Newton et al., *Nuc. Acids. Res.* 17:2503, 1989, incorporated herein by reference; see also Example 2). The PCR reaction
10 conditions are then adjusted so that product band is only produced when the primer and template are matched.

Useful PCR primers and conditions for detection of the Arg 16 and Gly 16 β_2 -adrenergic receptor gene alleles have been described (Turki et al., *J. Clin. Invest.* 95:1635, 1995, incorporated herein by reference; see also Example 2). As described in
15 that article, allele-specific PCR is based on the premise that, under the appropriate conditions, a match between template and primer at the most 3' nucleotide is necessary for the generation of a PCR product (i.e., mismatches result in no product). Allele-specific PCR reactions can be performed, for example, as follows:

Genomic DNA is isolated, for example, from 2 ml of peripheral blood, by any
20 available technique, such as the a cetylmethyl ammonium bromide separation technique (Jones et al., *Nature* 199:280, 1963). PCR reactions are carried out in a vol of 100 μ l using ~ 500 ng of genomic DNA. Preferred primer pairs that delineate the two polymorphisms at nucleic acid 46 (amino acid 16), include i) 5'-

CTTCTTGCTGGCACCCAATA-3'(sense) (SEQ ID NO:10) and 5'-

25 CCAATTTAGGAGGATGTAAACTTC-3' (antisense) (SEQ ID NO:11); ii) or the same antisense primer and 5'-CTTCTTGCTGGCACCCAATG-3' (sense) (SEQ ID NO:12).

The generated PCR product size using these primers is 913 bp. The polymerase Vent exo

5 (-) (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) can be used for these reactions. Reaction buffers are preferably those included with these polymerases from the manufacturers. Temperature cycling is preferably 98°C for 30 s, 66-68°C for 45 s, and 72°C for 45 s for 30 cycles, 20 μ l of the PCR reactions can be electrophoresed on 1% agarose gels and visualized with ethidium bromide staining and ultraviolet illumination.

10 The allele-specific PCR technique can be verified by direct dideoxy sequencing of PCR products, preferably using sequencing primers different from those used in the PCR. In addition, plasmids consisting of wildtype β_2 AR cDNA or mutated cDNA corresponding to the polymorphisms can be used as positive and negative control templates for the allele-specific PCR studies.

15

Hybridization Studies:

 GENERALLY: It has long been appreciated that differences in nucleotide sequence can usually be detected by oligonucleotide hybridization under appropriate conditions. Recently, Hall et al. (*Lancet* 345:1213, 1995, incorporated herein by reference) have
20 demonstrated that such techniques may reliably be used to detect sequence differences in the β_2 -adrenergic receptor gene. As they teach, samples of genomic DNA containing the β_2 -adrenergic receptor gene may be immobilized on a filter such as, for example, a Hybond® filter. In preferred methods, the relevant portion of the β_2 -adrenergic receptor gene (i.e., a portion that includes nucleotide 46, encoding residue 16, is amplified by
25 PCR, and the PCR product is affixed to the filter. The filter is then hybridized with excess unlabeled primer (to "block" nonspecific reactions). Subsequently, the filter is exposed to labeled primer under high-stringency conditions. The primer is designed to

5 hybridized with either the Gly16 or the Arg16 allele, but not with both under the hybridization conditions employed. In preferred embodiments, the filter is subsequently stripped and re-hybridized (or a duplicate filter is prepared and reacted in parallel) with a primer that reacts with the other allele.

10 *Restriction Fragment Length Polymorphism:*

The RFLP technique has long been a popular method for identifying sequence differences within a population (see, for example, Unit 2.7 of *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, incorporated herein by reference). The β_2 -adrenergic receptor gene contains a β an/site at position 523 (corresponding to amino acid 175 in the protein) that is polymorphic (see Ohe et al., *Tharax* 50:353, 1995). Although this polymorphism has not been shown to demonstrate linkage with the Arg16 \rightarrow Gly polymorphism, standard techniques could readily be employed to detect such a linkage if it exists, so that utilized in the practice of the present invention.

20 *Protein Assays*

The presence of β_2 -adrenergic receptor polymorphisms can also be detected through protein assays that can distinguish the Arg16 and Gly16 versions of the β_2 -adrenergic receptor protein. For example, Western blots could be performed using monoclonal antibodies specific for either variant. Western blot technologies are well known in the art.

EXAMPLE 4

5 **Kits for Identification of Individuals Susceptible to Adverse Responses to Chronic β -
Agonist Therapy**

As will be apparent to those of ordinary skill in the art, reagents useful in the practice of the present inventive methods can usefully be collected together in kits. For example, primer sets for allele-specific polymerase chain reaction studies can be provided together in a single container.

As described above in Example 3, β_2 -adrenergic receptor gene alleles can be distinguished from one another through use of primers whose 3'-most nucleotides hybridize with one allele but are mismatched with respect to others. Examples 2 and 3 describe particular useful primer sets, but those of ordinary skill in the art will readily recognize that variations in precise primer sequence can be made without departing from the spirit or scope of the present invention, so long as one primer set produces an amplification product from one β_2 -adrenergic receptor gene allele (e.g., the allele encoding the Arg16 variant), and a different primer set produces an amplification product from another allele (e.g., the allele encoding the Gly16 variant). Preferred allele-specific PCR kits also include other PCR reagents, such as buffer, salt solutions, dNTPs, control DNA including the Arg16 β_2 -adrenergic receptor gene allele, control DNA including the Gly16 β_2 -adrenergic receptor gene allele, and/or DNA polymerase. Preferably, the DNA polymerase is thermal-stable. Such kits may optionally include instructions for use.

Those of ordinary skill in the art will appreciate that analogous primer-containing kits may be prepared for ligation amplification reactions, which are based on the premise that adjacently-hybridized primers are only ligated together when their terminal residues are hybridized (see English et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 9:630, 1994, incorporated

5 herein by reference). Additional reagents optionally included in ligation amplification kits include buffers, salts, ligase (preferably thermal-stable ligase), ATP, control DNA including the Arg16 β_2 -adrenergic receptor gene allele, control DNA including the Gly16 β_2 -adrenergic receptor gene allele, and/or instructions for use.

10 Primer-containing kits may also be desirably prepared that do not contain allele-specific primer sets, but rather contain only a single set of primers, which primers amplify a region of the β_2 -adrenergic receptor gene that encodes residue 16. Preferred such kits also include PCR reagents and/or sequencing reagents. Preferably, dideoxy sequencing reagents are employed (see Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, Chapter
15 13, incorporated herein by reference). Preferred dideoxy sequencing reagents include, for example, a sequencing primer (that hybridizes either to the β_2 -adrenergic receptor gene amplification product or to a vector into which the product may be cloned), dNTPs, ddNTPs, buffers, salts, and/or instructions. In preferred embodiments, the dNTPs are provided either singly or in mixtures that are sets of three dNTPs. Preferred kits may
20 also (or alternatively) include detection reagents, such as, for example, radioactive or fluorescent. Particularly preferred kits are designed genetic analyzers and include fluorescently-tagged primers.

25 Some preferred kits also contain reagents for distinguishing other β_2 -adrenergic receptor gene alleles (e.g., alleles at other positions).

Other Embodiments

5 One of ordinary skill in the art will readily recognize that the foregoing has been merely a detailed description of certain preferred embodiments of the present invention. Various alterations and modifications of the procedures, techniques, and compositions described above will be apparent to those in the art and are intended to be encompassed by the following claims.

5

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

10

(i) APPLICANT: Drazen MD, Jeffrey

(ii) TITLE OF INVENTION: Diagnosing Asthma Patients Predisposed
to Adverse Beta-Agonist Reactions

15

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 9

(iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:

20

(A) ADDRESSEE: Choate, Hall & Stewart
(B) STREET: 53 State Street
(C) CITY: Boston
(D) STATE: MA
(E) COUNTRY: USA
(F) ZIP: 02109

25

(v) COMPUTER READABLE FORM:

(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30

30

(vi) CURRENT APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER: US
(B) FILING DATE:
(C) CLASSIFICATION:

35

(viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:

(A) NAME: Jarrell PhD, Brenda H.
(B) REGISTRATION NUMBER: 39,223
(C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: 0092662-0010

40

(ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:

(A) TELEPHONE: 617 248 4000
(B) TELEFAX: 617 248 5000

45

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

50

(A) LENGTH: 413 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: not relevant
(D) TOPOLOGY: not relevant

55

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(vii) IMMEDIATE SOURCE:

(B) CLONE: Human Beta-2-Adrenergic Receptor Protein

60

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

65

Met Gly Gln Pro Gly Asn Gly Ser Ala Phe Leu Leu Ala Pro Asn Arg
1 5 10 15Ser His Ala Pro Asp His Asp Val Thr Gln Gln Arg Asp Glu Val Trp
20 25 30

5 Val Val Gly Met Gly Ile Val Met Ser Leu Ile Val Leu Ala Ile Val
 35 40 45
 Phe Gly Asn Val Leu Val Ile Thr Ala Ile Ala Lys Phe Glu Arg Leu
 50 55 60
 10 Gln Thr Val Thr Asn Tyr Phe Ile Thr Ser Leu Ala Cys Ala Asp Leu
 65 70 75 80
 15 Val Met Gly Leu Ala Val Val Pro Phe Gly Ala Ala His Ile Leu Met
 85 90
 Lys Met Trp Thr Phe Gly Asn Phe Trp Cys Glu Phe Trp Thr Ser Ile
 100 105 110
 20 Asp Val Leu Cys Val Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Cys Val Ile Ala
 115 120 125
 Val Asp Arg Tyr Phe Ala Ile Thr Ser Pro Phe Lys Tyr Gln Ser Leu
 130 135 140
 25 Leu Thr Lys Asn Lys Ala Arg Val Ile Ile Leu Met Val Trp Ile Val
 145 150 155 160
 30 Ser Gly Leu Thr Ser Phe Leu Pro Ile Gln Met His Trp Tyr Arg Ala
 165 170 175
 Thr His Gln Glu Ala Ile Asn Cys Tyr Ala Asn Glu Thr Cys Cys Asp
 180 185 190
 35 Phe Phe Thr Asn Gln Ala Tyr Ala Ile Ala Ser Ser Ile Val Ser Phe
 195 200 205
 Tyr Val Pro Leu Val Ile Met Val Phe Val Tyr Ser Arg Val Phe Gln
 210 215 220
 40 Glu Ala Lys Arg Gln Leu Gln Lys Ile Asp Lys Ser Glu Gly Arg Phe
 225 230 235 240
 45 His Val Gln Asn Leu Ser Gln Val Glu Gln Asp Gly Arg Thr Gly His
 245 250 255
 Gly Leu Arg Arg Ser Ser Lys Phe Cys Leu Lys Glu His Lys Ala Leu
 260 265 270
 50 Lys Thr Leu Gly Ile Ile Met Gly Thr Phe Thr Leu Cys Trp Leu Pro
 275 280 285
 Phe Phe Ile Val Asn Ile Val His Val Ile Gln Asp Asn Leu Ile Arg
 290 295 300
 55 Lys Glu Val Tyr Ile Leu Leu Asn Trp Ile Gly Tyr Val Asn Ser Gly
 305 310 315 320
 60 Phe Asn Pro Leu Ile Tyr Cys Arg Ser Pro Asp Phe Arg Ile Ala Phe
 325 330 335
 Gln Glu Leu Leu Cys Leu Arg Arg Ser Ser Leu Lys Ala Tyr Gly Asn
 340 345 350
 65 Gly Tyr Ser Ser Asn Gly Asn Thr Gly Glu Gln Ser Gly Tyr His Val
 355 360 365
 Glu Gln Glu Lys Glu Asn Lys Leu Leu Cys Glu Asp Leu Pro Gly Thr
 370 375 380

5 Glu Asp Phe Val Gly His Gln Gly Thr Val Pro Ser Asp Asn Ile Asp
 385 390 395 400

Ser Gln Gly Arg Asn Cys Ser Thr Asn Asp Ser Leu Leu
 405 410

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 3451 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: both
(D) TOPOLOGY: not relevant

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(vii) IMMEDIATE SOURCE:

(B) CLONE: HUman Beta-2-Adrenergic Receptor Gene

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

| | | | | | | |
|-------------|-------------|------------|------------|------------|-------------|------|
| CCCGGGTTCA | AGAGATTCTC | CTGTCTCAGC | CTCCCGAGTA | GCTGGGACTA | CAGGTACGTG | 60 |
| CCACCACACC | TGGCTAATTT | TTGTATTTTT | AGTAGAGACA | AGAGTTACAC | CATATTGGCC | 120 |
| AGGATCTTTT | GCTTTCTATA | GCTTCAAAAT | GTTCTTAATG | TTAAGACATT | CTTAATACTC | 180 |
| TGAACCATAT | GAATTTGCCA | TTTTGGTAAG | TCACAGACGC | CAGATGGTGG | CAATTTCCACA | 240 |
| TGGCACAAACC | CGAAAGATTA | ACAAACTATC | CAGCAGATGA | AAGGATTTTT | TTTAGTTTCA | 300 |
| TTGGGTTTAC | TGAAGAAATT | GTTTGAATTC | TCATTGCATC | TCCAGTTCAA | CAGATAATGA | 360 |
| GTGAGTGATG | CCACACTCTC | AAGAGTTAAA | AACAAAACAA | CAAAAAAATT | AAAACAAAAG | 420 |
| CACACAAC TT | TCTCTCTCTG | TCCCAAAATA | CATACTTGCA | TACCCCCGCT | CCAGATAAAA | 480 |
| TCCAAAGGGT | AAAAC TGTCT | TCATGCCTGC | AAATTCCTAA | GGAGGGCACC | TAAAGTACTT | 540 |
| GACAGCGAGT | GTGCTGAGGA | AATCGGCAGC | TGTTGAAGTC | ACCTCCTGTG | CTCTTGCCAA | 600 |
| ATGTTTGAAA | GGGAATACAC | TGGGTTACCG | GGTGTATGTT | GGGAGGGGAG | CATTATCAGT | 660 |
| GCTCGGGTGA | GGCAAGTTCG | GAGTACCCAG | ATGGAGACAT | CCGTGTCTGT | GTCGCTCTGG | 720 |
| ATGCCTCCAA | GCCAGCGTGT | GTTTACTTTC | TGTGTGTGTC | ACCATGTCTT | TGTGCTTCTG | 780 |
| GGTGCTTCTG | TGTTTGTTTC | TGGCCGCGTT | TCTGTGTTGG | ACAGGGGTGA | CTTTGTGCCG | 840 |
| GATGGCTTCT | GTGTGAGAGC | GCGCGCGAGT | GTGCATGTCG | GTGAGCTGGG | AGGGTGTGTC | 900 |
| TCAGTG TCTA | TGGCTGTGGT | TCGGTATAAG | TCTGAGCATG | TCTGCCAGGG | TGTATTTGTG | 960 |
| CCTGTATGTG | CGTGCTCGG | TGGGCACTCT | CGTTTCCTTC | CGAATGTGGG | GCAGTGCCGG | 1020 |
| TGTGCTGCCC | TCTGCCTTGA | GACCTCAAGC | CGCGCAGGCG | CCCAGGGCAG | GCAGGTAGCG | 1080 |
| GCCACAGAAG | AGCCAAAAGC | TCCCGGGTTG | GCTGGTAAGG | ACACCACCTC | CAGCTTTAGC | 1140 |
| CCTCTGGGGC | CAGCCAGGGT | AGCCGGGAAG | CAGTGGTGGC | CCGCCCTCCA | GGGAGCAGTT | 1200 |
| GGGCCCCGCC | CGGGCCAGCC | CCAGGAGAAG | GAGGGCGAGG | GGAGGGGAGG | GAAAGGGGAG | 1260 |

| | | |
|----|--|------|
| 5 | GAGTGCCTCG CCCCTTCGCG GCTGCCGGCG TGCCATTGGC CGAAAGTTCC CGTACGTCAC | 1320 |
| | GGCGAGGGCA GTTCCCCTAA AGTCCTGTGC ACATAACGGG CAGAACGCAC TCGAAGCGG | 1380 |
| 10 | CTTCTTCAGA GCACGGGCTG GAACTGGCAG GCACCGCGAG CCCCTAGCAC CCGACAAGCT | 1440 |
| | GAGTGTGCAG GACGAGTCCC CACCACACCC ACACCACAGC CGCTGAATGA GGCTTCCAGG | 1500 |
| | CGTCCGCTCG CGGCCCGCAG AGCCCCGCGG TGGGTCCGCC CGCTGAGGCG CCCCCAGCCA | 1560 |
| 15 | GTGCGCTTAC CTGCCAGACT GCGCGCCATG GGGCAACCCG GGAACGGCAG CGCCTTCTTG | 1620 |
| | CTGGCACCCA ATAGAAGCCA TGCGCCGGAC CACGACGTCA CGCAGCAAAG GGACGAGGTG | 1680 |
| 20 | TGGGTGGTGG GCATGGGCAT CGTCATGTCT CTCATCGTCC TGGCCATCGT GTTTGGCAAT | 1740 |
| | GTGCTGGTCA TCACAGCCAT TGCCAAGTTC GAGCGTCTGC AGACGGTCAC CAACTACTTC | 1800 |
| | ATCACTTCAC TGGCCTGTGC TGATCTGGTC ATGGGCCTGG CAGTGGTGCC CTTTGGGGCC | 1860 |
| 25 | GCCCATATTC TTATGAAAAT GTGGACTTTT GGCAACTTCT GGTGCGAGTT TTGGACTTCC | 1920 |
| | ATTGATGTGC TGTGCGTCAC GGCCAGCAAT GAGACCCTGT GCGTGATCGC AGTGGATCGC | 1980 |
| 30 | TACTTTGCCA TTACTTCACC TTTCAAGTAC CAGAGCCTGC TGACCAAGAA TAAGGCCCGG | 2040 |
| | GTGATCATTC TGATGGTGTG GATTGTGTCA GGCCTTACCT CCTTCTTGCC CATTGAGATG | 2100 |
| | CAC TGGTACC GGGCCACCCA CCAGGAAGCC ATCAACTGCT ATGCCAATGA GACCTGCTGT | 2160 |
| 35 | GACTTCTTCA CGAACCAAGC CTATGCCAAT GCCTCTTCCA TCGTGTCTT CTACGTTCCC | 2220 |
| | CTGGTGATCA TGGTCTTCGT CTA CTCCAGG GTCTTTCAGG AGGCCAAAAG GCAGCTCCAG | 2280 |
| 40 | AAGATTGACA AATCTGAGGG CCGCTTCCAT GTCCAGAACC TTAGCCAGGT GGAGCAGGAT | 2340 |
| | GGGCGGACGG GGCATGGACT CCGCAGATCT TCCAAGTTCT GCTTGAAGGA GCACAAAGCC | 2400 |
| | CTCAAGACGT TAGGCATCAT CATGGGCACT TTCACCCTCT GCTGGCTGCC CTTCTTCATC | 2460 |
| 45 | GTTAACATTG TGCATGTGAT CCAGGATAAC CTCATCCGTA AGGAAGTTTA CATCCTCCTA | 2520 |
| | AATTGGATAG GCTATGTCAA TTCTGGTTTC AATCCCCTTA TCTACTGCCG GAGCCCAGAT | 2580 |
| 50 | TTCAGGATTG CCTTCCAGGA GCTTCTGTGC CTGCGCAGGT CTTCTTTGAA GGCCTATGGG | 2640 |
| | AATGGCTACT CCAGCAACGG CAACACAGGG GAGCAGAGTG GATATCACGT GGAACAGGAG | 2700 |
| | AAAGAAAATA AACTGCTGTG TGAAGACCTC CCAGGCACGG AAGACTTTGT GGGCCATCAA | 2760 |
| 55 | GGTACTGTGC CTAGCGATAA CATTGATTCA CAAGGGAGGA ATTGTAGTAC AAATGACTCA | 2820 |
| | CTGCTGTAAA GCAGTTTTTC TACTTTTAAA GACCCCCCCC CCCCCAACAG AACACTAAAC | 2880 |
| 60 | AGACTATTTA ACTTGAGGGT AATAAACTTA GAATAAAATT GTAAAAATTG TATAGAGATA | 2940 |
| | TGCAGAAGGA AGGGCATCCT TCTGCCTTTT TTATTTTTTT AAGCTGTAAA AAGAGAGAAA | 3000 |
| | ACTTATTTGA GTGATTATTT GTTATTTGTA CAGTTCAGTT CCTCTTTGCA TGGAAATTTGT | 3060 |
| 65 | AAGTTTATGT CTAAAGAGCT TTAGTCCTAG AGGACCTGAG TCTGCTATAT TTTCATGACT | 3120 |
| | TTTCCATGTA TCTACCTCAC TATTCAAGTA TTAGGGGTAA TATATTGCTG CTGGTAATTT | 3180 |
| | GTATCTGAAG GAGATTTTCC TTCCTACACC CTTGGACTTG AGGATTTTGA GTATCTCGGA | 3240 |

5 CCTTTCAGCT GTGAACATGG ACTCTTCCCC CACTCCTCTT ATTTGCTCAC ACGGGGTATT 3300
TTAGGCAGGG ATTTGAGGAG CAGCTTCAGT TGTTTTCCCG AGCAAAGGTC TAAAGTTTAC 3360
10 AGTAAATAAA ATGTTTGACC ATGCCTTCAT TGCACCTGTT TGTCCAAAAC CCCTTGACTG 3420
GAGTGCTGTT GCCTCCCCCA CTGGAAACCG C 3451

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

15 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 21 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
20 (ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

25 (vii) IMMEDIATE SOURCE:
(B) CLONE: wild-type forward primer A1

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

30 GCCTCTTGCT GGCACCCAAA A 21

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

35 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 22 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
40 (ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

45 (vii) IMMEDIATE SOURCE:
(B) CLONE: polymorphism-specific primer A2

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

50 GCCTTCTTGC TGGCACCCAA AG 22

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

55 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 21 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
60 (ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

65 (vii) IMMEDIATE SOURCE:
(B) CLONE: reverse primer Rev

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

5 AGGATAACCT CATCCGTAAG G

21

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 22 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(vii) IMMEDIATE SOURCE:

- (B) CLONE: wild-type forward primer B1

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6:

25 CCGGACCACG ACGTCACGCA AC

22

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 22 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(vii) IMMEDIATE SOURCE:

- (B) CLONE: polymorphism-specific forward primer B2

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:7:

45 CCGGACCACG ACGTCACGCA AG

22

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:8:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 20 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(vii) IMMEDIATE SOURCE:

- (B) CLONE: Beta-golbin forward primer BG1

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:8:

65 GCTGTCATCA CTTAGACCTC

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:9:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

5 (A) LENGTH: 20 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

10 (ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(vii) IMMEDIATE SOURCE:
15 (B) CLONE: Beta-globin reverse primer BG2

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:9:

20 CAGACGAATG ATTGCATCAG

20

Claims

1 1. A method of identifying individuals susceptible to adverse responses to regular β -
2 agonist administration, the method comprising steps of:

3 i) providing a genomic nucleic acid sample from an individual;

4
5 ii) identifying in said sample a first and second allele of the individuals β_2 -
6 adrenergic receptor gene; and

7
8 iii) classifying the individual as susceptible to adverse responses to regular β -
9 agonist administration if the first and second alleles of the β_2 -adrenergic receptor
10 gene both encode Arg at residue 16 of the β_2 -adrenergic receptor protein.

11
12 2. The method of claim 1 wherein the step of identifying employs a technique
13 selected from the group consisting of: denaturing gel electrophoresis, allele-specific
14 polymerase chain reaction amplification, single strand conformation polymorphism
15 analysis, restriction fragment length polymorphism analysis, and allele-specific
16 hybridization.

17
18 3. The method of claim 1, wherein the step of identifying comprises amplifying a
19 first portion of the first β_2 -adrenergic receptor gene allele, and a second portion of the
20 second β_2 -adrenergic receptor gene, which first and second portions each include a
21 sequence encoding residue 16 of the β_2 -adrenergic receptor protein.

22
23 4. The method of claim 3, wherein the step of identifying further comprises
24 determining the nucleotide sequences of said portions.

25
26 5. The method of claim 4 wherein the step of determining constitutes automated
27 sequence analysis.

1 6. The method of claim 3, wherein the step of identifying comprises amplifying said
2 first portion through use of a primer set that amplifies a sequence encoding Arg at residue
3 16 of the β_2 -adrenergic receptor protein but does not amplify a sequence encoding Gly at
4 residue 16.

5
6 7. The method of claim 3, wherein the step of identifying comprises amplifying said
7 first portion through use of a primer set that amplifies a sequence encoding Gly at residue
8 16 of the β_2 -adrenergic receptor protein but does not amplify a sequence encoding Arg at
9 residue 16.

10
11 8. The method of claim 6, wherein the primer set comprises a first primer having a
12 nucleotide sequence including SEQ ID NO:3 and a second primer having a nucleotide
13 sequence including SEQ ID NO:5.

14
15 9. The method of claim 7, wherein the primer set comprises a first primer having a
16 nucleotide sequence including SEQ ID NO:4 and a second primer having a nucleotide
17 sequence including SEQ ID NO:5.

18
19
20 10. A kit comprising:

21 a first set of primers selected to hybridize to a first portion of a human β_2 -
22 adrenergic receptor gene, which first portion includes a sequence encoding position 16 of
23 said human β_2 -adrenergic receptor, in such a manner that, when used in a polymerase
24 chain reaction, said second set of primers amplifies said portion when position 16 is Arg
25 but not when position 16 is Gly; and

26 a second set of primers selected to hybridize to said first portion of a human β_2 -
27 adrenergic receptor gene in such a manner that, when used in a polymerase chain
28 reaction, said second set of primers amplifies said portion when position 16 is Gly but not
29 when position 16 is Arg,

30 set first and second sets of primers being provided together in a container.

31

11. The kit of claim 10 further comprising a component selected from the group consisting of: amplification buffer, water, DNA polymerase, first control DNA including a first human β_2 -adrenergic receptor gene that encodes Arg at human β_2 -adrenergic receptor position 16, second control DNA including a second human β_2 -adrenergic receptor gene allele that encodes Gly at human β_2 -adrenergic receptor position 16, instructions for use, and combinations thereof.

12. A kit comprising:

a primer set selected to hybridize to a human β_2 -adrenergic receptor gene in which a manner that, when used in a polymerase chain reaction, the primer set amplifies a portion of said human β_2 -adrenergic receptor gene, which portion includes a sequence encoding human β_2 -adrenergic receptor residue 16; and

reagents for determining the nucleotide sequence of said amplified portion, said primer set and reagents being arranged together in a container.

13. The kit of claim 12, wherein said reagents are selected from the group consisting of: a sequencing primer that hybridizes to a piece of said amplified portion in such a way that allows extension across said sequence encoding human β_2 -adrenergic receptor residue 16, DNA polymerase, dNTPs, ddNTPs, buffer, and combinations thereof.

14. The kit of claim 12, wherein said sequencing primer is fluorescently labeled for use in an automated genetic analyzer.

15. The kit of claim 12 further comprising a component selected from the group consisting of amplification buffer, water, DNA polymerase, first control DNA including a first human β_2 -adrenergic receptor gene that encodes Arg at human β_2 -adrenergic receptor position 16, second control DNA including a second human β_2 -adrenergic receptor gene allele that encodes Gly at human β_2 -adrenergic receptor position 16, instructions for use, and combinations thereof.

16. A kit comprising:

1 an oligonucleotide primer that hybridizes to a portion of a human β_2 -adrenergic
2 receptor gene, which portion includes a sequence encoding residue 16 of the human β_2 -
3 adrenergic receptor, said oligonucleotide having higher affinity for said portion when said
4 sequence encodes Arg than it has when said sequence encodes Gly; and

5 an oligonucleotide primer that hybridizes to a portion of a human β_2 -adrenergic
6 receptor gene, which portion includes a sequence encoding residue 16 of the human β_2 -
7 adrenergic receptor, said oligonucleotide having higher affinity for said portion when said
8 sequence encodes Gly than it has when said sequence encodes Arg.

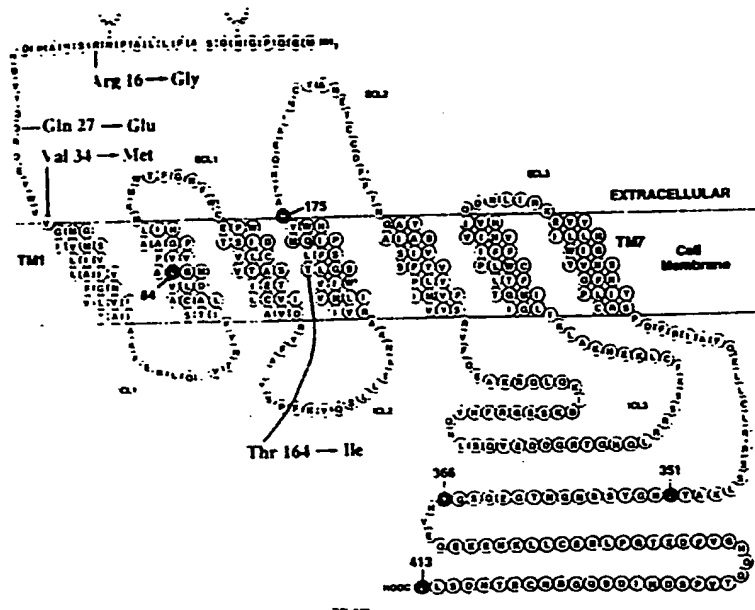
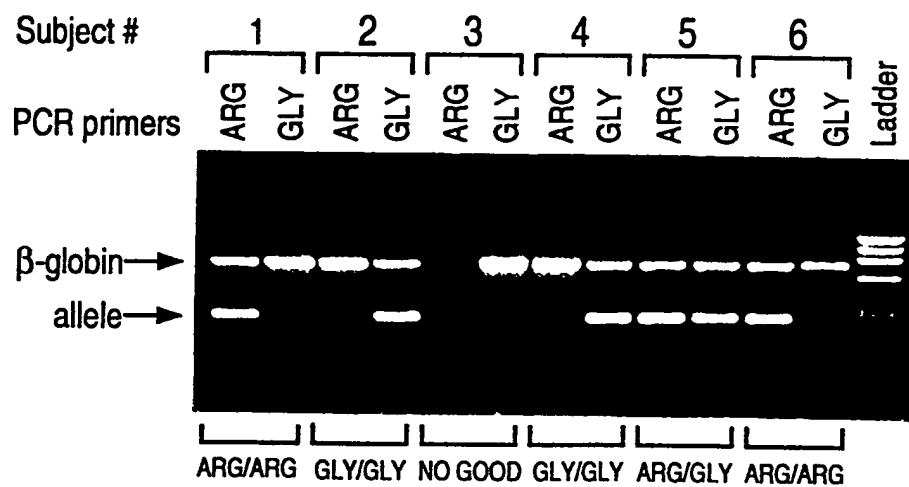


Figure 1

2/3

*Figure 2*

3/3

Figure 3A.

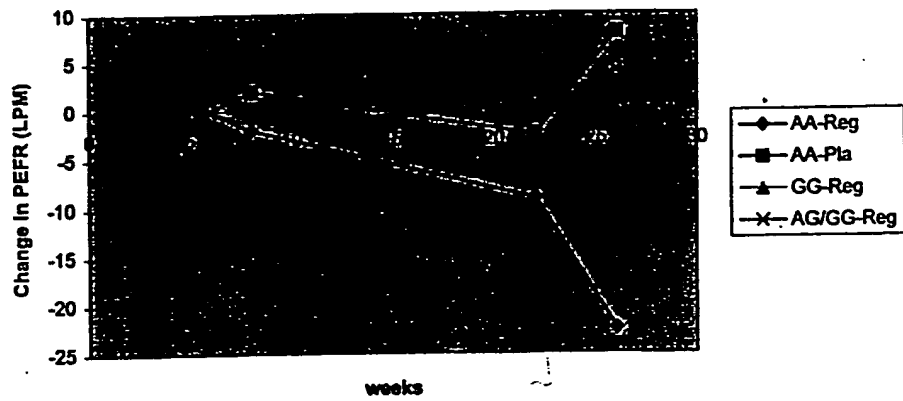
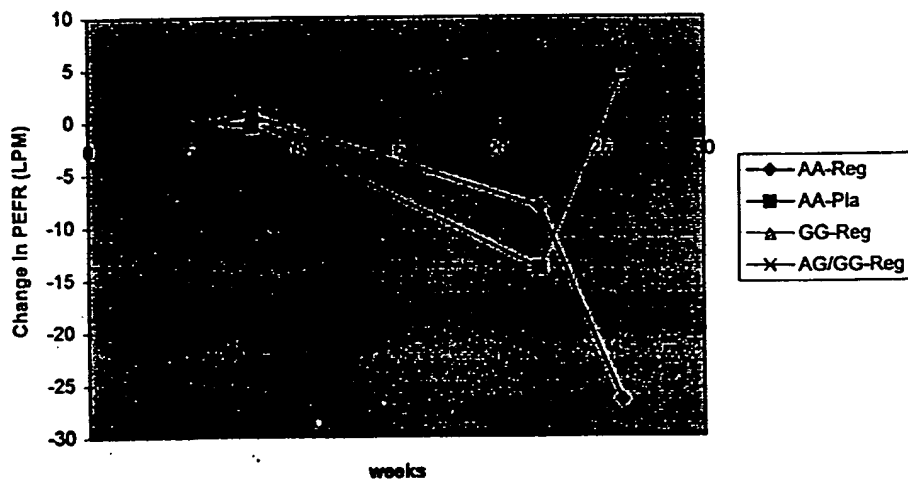


Figure 3B.



PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

| | | |
|---|--|---|
| Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts PCT/MDC 9803 | WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5 | |
| Internationales Aktenzeichen PCT/DE 98/ 03818 | Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 30/12/1998 | (Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 30/12/1997 |
| Anmelder MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN et al. | | |

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 5 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☒ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☒ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☐ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☒ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 1

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☒ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☐ keine der Abb.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/12 C12Q1/68 C07K14/705

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07K C12N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie ^o | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------------------|--|--------------------|
| X | LIGGETT S.: "Polymorphisms of the beta-2 adrenergic receptor and asthma" AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY AND CRITICAL CARE MEDICINE, Bd. 156, Nr. 4, Oktober 1997, Seiten S156-S162, XP002106240 siehe insbes. Abb. 1 --- -/-- | 1,2 |



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

^o Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. Juni 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

30/06/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Kania, T

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie° | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--|
| X | <p>TURKI J ET AL: "Myocardial signaling defects and impaired cardiac function of a human beta 2 - adrenergic receptor polymorphism expressed in transgenic mice."</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, (1996 SEP 17) 93 (19) 10483-8. JOURNAL CODE: PV3. ISSN: 0027-8424., XP002106241</p> <p>United States siehe das ganze Dokument</p> <p>---</p> | 1,2,33 |
| X | <p>TURKI J. ET AL.: "GENETIC POLYMORPHISMS OF THE BETA2-ADRENERGIC RECEPTOR IN NOCTURNAL AND NONNOCTURNAL ASTHMA" JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, Bd. 95, 1995, Seiten 1635-1641, XP002106242</p> <p>siehe das ganze Dokument</p> <p>---</p> | 1,2,9, 10, 17-21, 24,26, 27,29, 31-33 |
| X | <p>LARGE V. ET AL.: "Human beta-2 adrenoceptor gene polymorphisms are highly frequent in obesity and associate with altered adipocyte beta-2 adrenoceptor function"</p> <p>JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, Bd. 100, Nr. 12, 1997, Seiten 3005-3013, XP002106243</p> <p>siehe das ganze Dokument</p> <p>---</p> | 1,2,9, 17,18, 22,24, 26,31 |
| A | <p>PAROLA A L ET AL: "The peptide product of a 5' leader cistron in the beta 2 adrenergic receptor mRNA inhibits receptor synthesis."</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, (1994 FEB 11) 269 (6) 4497-505. JOURNAL CODE: HIV. ISSN: 0021-9258., XP002106244</p> <p>United States in der Anmeldung erwähnt siehe insbes. Abb. 2</p> <p>---</p> | 1-33 |
| A | <p>KOBILKA B K ET AL: "Functional activity and regulation of human beta 2 - adrenergic receptors expressed in Xenopus oocytes."</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, (1987 NOV 15) 262 (32) 15796-802. JOURNAL CODE: HIV. ISSN: 0021-9258., XP002106245</p> <p>United States in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p> | 1-33 |

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| A | HALL I.: "Beta-2 adrenoceptor polymorphisms: are they clinically important ?" THORAX, Bd. 51, 1996, Seiten 351-353, XP002106246 siehe das ganze Dokument ---- | 1-33 |
| P,X | TIMMERMANN B ET AL: "Novel DNA sequence differences in the beta2 - adrenergic receptor gene promoter region." HUMAN MUTATION, (1998) 11 (4) 343-4. JOURNAL CODE: BRD. ISSN: 1059-7794., XP002106247 United States siehe Zusammenfassung ---- | 1-8 |
| P,X | TIMMERMANN B. ET AL: ".beta.-2 Adrenoceptor genetic variation is associated with genetic predisposition to essential hypertension: The Bergen Blood Pressure Study" KIDNEY INTERNATIONAL, (1998) 53/6 (1455-1460). REFS: 32 ISSN: 0085-2538 CODEN: KDYIA5, XP002106248 United States siehe das ganze Dokument ---- | 1-33 |
| P,X | MCGRAW D W ET AL: "Polymorphisms of the 5' leader cistron of the human beta2 - adrenergic receptor regulate receptor expression." JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, (1998 DEC 1) 102 (11) 1927-32. JOURNAL CODE: HS7. ISSN: 0021-9738., XP002106249 United States siehe das ganze Dokument ---- | 1-33 |
| T | SCOTT M G ET AL: "Identification of novel polymorphisms within the promoter region of the human beta2 adrenergic receptor gene." BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY, (1999 FEB) 126 (4) 841-4. JOURNAL CODE: B00. ISSN: 0007-1188., XP002106250 ENGLAND: United Kingdom siehe das ganze Dokument ----- | 1-33 |

Feld III

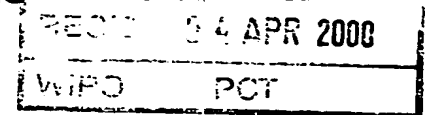
WORTLAUT DER ZUSAMMENFASSUNG (Fortsetzung von Punkt 5 auf Blatt 1)

Die Erfindung betrifft neue Sequenzvarianten des menschlichen beta2-adrenergen Rezeptorgens und ihre Verwendung zur Diagnose eines Spektrums von Erkrankungen, insbesondere zur Feststellung von Bluthochdruck-Dispositionen, zur Diagnose einer individuell unterschiedlichen Ansprechbarkeit auf Therapeutika und zur Therapeutika-Entwicklung auf der Basis pharmakogenetischer Prinzipien.

127

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT



INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT



(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

| | | |
|---|---|--|
| Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts PCT/MDC 9803 | WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416) | |
| Internationales Aktenzeichen PCT/DE98/03818 | Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 30/12/1998 | Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 30/12/1997 |
| Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/12 | | |
| Anmelder MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN et al. | | |

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 7 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
- ☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).
- Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

| | |
|--|---|
| Datum der Einreichung des Antrags 26/07/1999 | Datum der Fertigstellung dieses Berichts 30.03.2000 |
| Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465 | Bevollmächtigter Bediensteter Barnas, C Tel. Nr. +49 89 2399 7469  |

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-10 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-33 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1-5 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

3. ☒ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

siehe Beiblatt

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- ☐ die gesamte internationale Anmeldung.
☒ Ansprüche Nr. 24-33.

Begründung:

- ☐ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
- ☒ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. 24-33 sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
- siehe Beiblatt
- ☒ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 24-33 sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- ☐ Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

| | | |
|--------------------------------|-----------------|-------------------------|
| Neuheit (N) | Ja: Ansprüche | 3-8, 11-16, 19-21, 23 |
| | Nein: Ansprüche | 1, 2, 9, 10, 17, 18, 22 |
| Erfinderische Tätigkeit (ET) | Ja: Ansprüche | 3-8, 11-16, 19-21, 23 |
| | Nein: Ansprüche | |
| Gewerbliche Anwendbarkeit (GA) | Ja: Ansprüche | 1-23 |
| | Nein: Ansprüche | |

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

siehe Beiblatt

Zu Punkt I

Grundlage des Berichts

Disclaimer:

Die mit dem Schreiben von 13.1.2000 (eingegangen am 15.1.2000) eingereichten Ansprüchen 1, 2 und 9 beinhalten Disclaimer, die besagten Ansprüchen Neuheit gegenüber den Dokumenten D1 und D2 verleihen sollen. Ein Disclaimer ist jedoch nur zu erlauben, wenn er sich auf den Offenbarungsgehalt des neuheitsschädlichen Dokumentes beschränkt, vorausgesetzt, daß die Lehre des besagten Dokuments zufällig neuheitsschädlich ist.

D1 und D2 offenbaren spezifische Basenaustausche an den Positionen 1633, 1666 und 2078 in der Sequenz des menschlichen beta2-adrenergen Rezeptorgens sowie Verfahren zur Bestimmung von Dispositionen für Nacht-Asthma und Fettsucht durch Genotypisierung an den Positionen 1633 und 1666 (siehe Zu Punkt V, Absätze 1-3, Neuheit). Die neu eingeführten Disclaimer schließen jedoch nicht diese Lehre aus, sondern beschreiben die obligatorische Kombination von Austauschen bzw. Genotypisierungen an den Positionen 1633, 1666 und 2078 mit Austauschen bzw. Genotypisierungen an mindestens einer der übrigen, in der vorliegenden Anmeldung offenbarten Positionen. Diese obligatorischen Kombinationen stellt ein neues technisches Merkmal dar, welches in der ursprünglichen Fassung der vorliegenden Anmeldung nicht offenbart ist.

Die mit dem Schreiben vom 13.1.2000 eingereichten Ansprüche genügen daher nicht den Bedingungen von Art. 34 (2)(b) PCT und wurden somit für diesen Bericht nicht berücksichtigt (Regel 70 (2)(c) PCT).

Zu Punkt III

Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit für die Ansprüche 24-33.

1. Mangelnde Offenbarung (Art. 5 PCT):

1.1. Die Ansprüche 24-33 betreffen verschiedene Verwendungen der Sequenzen gemäß

Ansprüchen 1-8 oder der Verfahren nach Ansprüchen 9-17, unter anderem zur Entwicklung von Therapeutika, zum Aufbau von Genen oder zur Prädiktion der Ansprechbarkeit auf Therapeutika. Keine dieser Verwendungsarten ist in der Beschreibung so offenbart, daß sie vom Fachmann ohne unzumutbaren Aufwand ausgeführt werden kann. Die Beschreibung gibt keinen Aufschluß darüber ob und wie die Sequenzvarianten für die beanspruchten Zwecke verwendet werden können. Darüber hinaus ist völlig unklar ob die **Entwicklung** von Therapeutika oder Agonisten/Antagonisten tatsächlich zu einem wirksamen Therapeutikum führt.

2. Mangelnde Klarheit (Art. 6 PCT):

2.1. Abhängige Ansprüche können sich nur auf Ansprüche derselben Anspruchskategorie beziehen. Im Gegensatz dazu beziehen sich jedoch die Verwendungsansprüche 27-29 auf Verfahrensansprüche und der Verwendungsanspruch 33 auf Produkt.- und Verfahrensansprüche.

2.2. Die Verwendungsansprüche 24-33 sind ausschließlich durch das zu erreichende Ergebnis definiert, ohne anzugeben wie dieses Ergebnis erreicht werden kann. Damit wird lediglich die zu lösende Aufgabe angegeben.

2.3. Die Bedeutung des Ausdrucks "Intervention" in Anspruch 29 ist nicht klar.

3. Aufgrund der erheblichen Einwände unter Art. 5 und 6 PCT, ist eine sinnvolle Prüfung von Neuheit und erfinderischer Tätigkeit der genannten Ansprüche nicht möglich.

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: TURKI J. ET AL.: 'GENETIC POLYMORPHISMS OF THE BETA2-ADRENERGIC RECEPTOR IN NOCTURNAL AND NONNOCTURNAL ASTHMA' JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, Bd. 95, 1995, Seiten 1635-1641, XP002106242

D2: LARGE V. ET AL.: 'Human beta-2 adrenoceptor gene polymorphisms are highly frequent

in obesity and associate with altered adipocyte beta-2 adrenoceptor function' JOURNAL
OF CLINICAL INVESTIGATION, Bd. 100, Nr. 12, 1997, Seiten 3005-3013,
XP002106243

1. Ansprüche 1, 2, 9, 10, 17, 18 und 22 sind nicht neu gemäß Art. 33 (2) PCT.

1.1. D1 (S1636, Tabelle 1) offenbart die Basenaustausche A->G (Position 1633), C->G (Position 1666) und C->T (Position 2078) in der Sequenz des menschlichen beta2-andrenergenen Rezeptorgens. D1 offenbart somit inhärent die Sequenz des menschlichen beta2-andrenergenen Rezeptorgens, dadurch gekennzeichnet, daß sie oben genannte Basenaustausche enthalten. **Ansprüche 1 und 2** sind daher, sofern sie sich auf oben genannte Basenaustausche beziehen, nicht neu gegenüber D1.

1.2. D1 (S1636, linke Spalte, Absatz 3-rechte Spalte Absatz 1; S1637, rechte Spalte, Absatz 2, Z2-14 und Tabelle 4) offenbart weiters eine Korrelation zwischen dem Basenaustausch A->G (Position 1633) und Nacht-Asthma. Aus der Lehre von D1 wäre daher dem Fachmann klar, daß die Genotypisierung an der Position 1633 ein Verfahren zur Bestimmung einer Disposition für Nacht-Asthma darstellt. D1 offenbart daher inhärent ein Verfahren gemäß den **Ansprüchen 9, 10, 17 und 18** und ist somit gegenüber diesen Ansprüchen neuheitsschädlich.

1.3. Die gleiche Argumentation wie unter Absatz 2 trifft auch auf die Lehre von D2 zu: D2 (Zusammenfassung, Z10-12; S3006, linke Spalte, Absatz 3; S3008, linke Spalte, letzter Absatz, Z1-2 und Tabellen 1 und 2) offenbart eine Korrelation zwischen dem Basenaustausch C->G (Position 1666) und Fettsucht. D2 ist daher neuheitsschädlich für den Gegenstand von **Ansprüchen 1, 2, 9, 17, 18 und 22**.

2. Neuheit und erfinderische Tätigkeit, Art 33 (2)(3) PCT

Sequenzen des menschlichen beta2-andrenergenen Rezeptorgens nach Ansprüchen 3-8 sowie Verfahren zur Bestimmung von Krankheitsdispositionen nach Ansprüchen 11-16, 19-21 und 23 sind aus den zitiertem Stand der Technik weder bekannt noch daraus in naheliegender Weise ableitbar. Besagte Ansprüche sind daher neu und scheinen erfinderisch gemäß Art. 33 (2)(3) PCT (siehe jedoch Zu Punkt VIII, Absatz 2).

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Art. 6 PCT, Mangelnde Klarheit, Mangelnde Stützung durch die Beschreibung

1. Der unabhängige Anspruch 9 ist nicht klar: Dieser Anspruch enthält nicht das technische Merkmal "menschliches beta2-andrenergene Rezeptorgen" und steht somit in keinem technischen Zusammenhang mit dem übrigen Gegenstand der Anmeldung und erfüllt somit auch nicht das Kriterium der Einheitlichkeit der Erfindung nach Regel 13 (1)(2) PCT. Weiters gibt Anspruch 9 nicht an welche der "ausgetauschten Positionen" genotypisiert werden sollen. Für die Prüfung dieses Anspruchs wurde angenommen, daß es sich bei der "DNA eines Probanden" um die Sequenz des menschlichen beta2-andrenergenen Rezeptorgens handelt und bei den "ausgetauschten Positionen" um jene Positionen, die in Anspruch 1 sowie in der Beschreibung angegeben sind. Diese Merkmale müssen daher in den Anspruch aufgenommen werden, um die Einwände zu beheben.
2. In der Beschreibung (S6, Absatz 1; S7, Z5-9, 15-19) wird offenbart, daß das Auffinden von **spezifischen** Basenaustauschen an **spezifischen** Positionen des menschlichen beta2-andrenergenen Rezeptorgens ein Verfahren zur Bestimmung von **spezifischen** Krankheitsdispositionen darstellen kann. Diese spezifische Lehre in der Beschreibung steht in Gegensatz zu dem sehr breit gefaßten Wortlaut der Ansprüche 18-21 und 23. Der Gegenstand besagter Ansprüche daher nicht in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt.
3. Der Ausdruck "Krankheitsdispositionen 9, 11 oder 15" in Anspruch 16 ist nicht klar.